

CAROLINE MÜLLER

**RESPOSTA FOTOSSINTÉTICA À TOXIDAZ DE FERRO EM
DIFERENTES CULTIVARES DE ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

CAROLINE MÜLLER

**RESPOSTA FOTOSSINTÉTICA À TOXIDAZ DE FERRO EM
DIFERENTES CULTIVARES DE ARROZ**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia Vegetal,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae***

APROVADA: 29 de abril de 2011

PhD. Décio Karam

Prof. Eduardo Gusmão Pereira

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro

**Prof^a. Andréa Miyasaki de Almeida
(Co-orientadora)**

**Prof. Marco Antonio Oliva Cano
(Orientador)**

*Aos meus pais, ofereço.
Às minhas irmãs, dedico.*

*“[...] talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
Mas lutei para que o melhor fosse feito[...]
Não sou o que deveria ser,
Mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*
Marthín Luther King

*"Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir.
Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida
e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz."*

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

À Deus e minha família, mãe Genecy, pai Bernardo, irmãs Vanessa, Aline e Evelyn e ao sobrinho Luca Rafael, pela grandiosa força concedida ao longo de mais uma jornada.

Ao orientador professor Marco Antonio Oliva, às co-orientadoras, Andréa Miyasaka e Kacilda Naomi Kuki e ao “co-orientador adotivo” Marcelo Ehlers Loureiro pela orientação e comprometimento. Sou imensamente grata pela oportunidade de trabalhar com essa equipe, por cada voto de confiança, incentivo e, mas do que isso, pela amizade proporcionada!

Aos membros da banca, professor Eduardo Gusmão Pereira e pesquisador Décio Karam pela disponibilidade e valiosas considerações.

Aos professores Cosme Damião Cruz e Júlio César Lima Neves pelos preciosos ensinamentos em estatística multivariada.

Aos demais professores do programa de Fisiologia Vegetal pela disponibilidade de equipamentos e auxílio direto ou indireto para o desenvolvimento desta pesquisa. E aos funcionários do Departamento, em especial aos técnicos Rogério Gomide, João, Carlos Raimundo, Reginaldo, Osvaldo, Zé Antonio e as secretárias Cássia, Luciene, Francine e Ângelo, pelo constante auxílio, disponibilidade e atenção.

À equipe do projeto Daniel, Laíse, Solange, Eduardo Pereira, Eduardo Almeida e Advânio, que participaram efetivamente deste trabalho, pela infinita ajuda e amizade.

Ao Thales, meu namorado, pelo companheirismo e incentivo em todos os momentos.

Aos amigos conquistados em Viçosa, que fizeram desses quatro anos, anos mais alegres.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, e à Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade oferecida.

BIOGRAFIA

Caroline Müller, filha de Genecy Maria Cerezer e Bernardo Leopoldo Müller, nasceu em Toledo, Estado do Paraná, no dia 01 de novembro de 1982. Em fevereiro de 2005, graduou-se em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, *campus* de Dourados. Em março de 2007 obteve o título de mestre em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa. No mesmo ano iniciou o curso de doutorado pelo programa em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa, concluído em abril de 2011.

CONTEÚDO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
OBJETIVO GERAL	10
CAPÍTULO 1. ALTERAÇÕES MOLECULARES, ENZIMÁTICAS, FOTOSSINTÉTICAS E ANATÔMICAS EM ARROZ CULTIVADO SOB EXCESSO DE FERRO.....	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Condições de cultivo e aplicação dos tratamentos	15
2.2. Variáveis avaliadas	15
2.2.1. Composição mineral do material vegetal.....	15
2.2.2. Determinação das trocas gasosas	16
2.2.3. Fluorescência e Imagem da fluorescência da clorofila <i>a</i>	16
2.2.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real (qPCR)	17
2.2.5. Atividade de enzimas antioxidativas	19
2.2.6. Caracterização Anatômica Foliar.....	20
2.3. Análise Estatística	20
3. RESULTADOS	21
3.1. Teor de ferro, índice de translocação	21
3.2. Composição Mineral	22
3.3. Trocas gasosas	24
3.4. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	26
3.5. Expressão gênica	30
3.6. Atividade de enzimas antioxidantes	32
3.7. Sintomas visuais e caracterização foliar da fitotoxidez.....	33
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÕES	41
6. ANEXOS	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

CAPÍTULO 2. FOTOSSÍNTESE E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i> COMO FERRAMENTAS DE SELEÇÃO DE CULTIVARES DE ARROZ RESISTENTES AO FERRO	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAIS E MÉTODOS	56
2.1. Condições de cultivo e Aplicação do tratamento	56
2.2. Variáveis Analisadas	56
2.2.1. Absorção do ferro e composição mineral do material vegetal.....	56
2.2.2. Determinação das trocas gasosas.....	57
2.2.3. Avaliação carboxilativa e regeneração da RuBP.....	57
2.2.4. Determinação da fotorrespiração <i>in vivo</i>	58
2.2.5. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	59
2.2.6. Determinação do malonaldeído	59
2.2.7. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real (qPCR)	60
2.3. Análise Estatística	61
3. RESULTADOS	62
3.1. Teor de ferro nos tecidos	62
3.2. Composição Mineral	63
3.3. Parâmetros de Trocas gasosas e Fotorrespiração	65
3.4. Parâmetros de Fluorescência da clorofila <i>a</i>	68
3.6. Expressão gênica	70
4. DISCUSSÃO	74
5. CONCLUSÕES	80
6. ANEXOS	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

CAPÍTULO 3. BASES FISIOLÓGICAS PARA A SELEÇÃO DE CULTIVARES DE ARROZ TOLERANTES A TOXIDEZ POR FERRO	94
1. INTRODUÇÃO	95
2. MATERIAIS E MÉTODOS	97
2.1. Condições de cultivo e Aplicação do tratamento.....	97
2.2. Variáveis avaliadas	97
2.2.1. Composição mineral do material vegetal.....	97

2.2.2. Determinação das trocas gasosas.....	98
2.2.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	98
2.2.4. Determinações de pigmentos cloroplastídicos.....	99
2.2.5. Determinação dos teores de malonaldeído.....	99
2.3. Análise Estatística.....	100
3. RESULTADOS.....	101
4. DISCUSSÃO.....	112
5. CONCLUSÕES.....	115
6. ANEXOS.....	116
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
CONCLUSÕES GERAIS.....	124

RESUMO

MÜLLER, Caroline. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2011. **Resposta fotossintética à toxidez de ferro em diferentes cultivares de arroz.** Orientador: Marco Antonio Oliva Cano. Co-orientadoras: Andréa Miyasaka de Almeida e Kacilda Naomi Kuki.

O ferro é um nutriente essencial para as plantas. No entanto, a disponibilidade deste elemento para as plantas varia com as condições do solo e sistema de cultivo. *Oryza sativa* pode ser cultivado em dois sistemas distintos: irrigado e sequeiro. Em solos inundados, devido as condições anaeróbicas e de baixo pH, o ferro pode ser reduzido tornando-se altamente disponível. A absorção excessiva de ferro pode gerar toxidez nas plantas de arroz ocasionando perda de produtividade. Desta forma, o presente trabalho objetivou estabelecer uma relação entre os mecanismos fotoquímicos, bioquímicos, moleculares e de dissipação de energia em diferentes cultivares de arroz que permitam realizar uma seleção de cultivares tolerantes ao ferro. A utilização de citrato férrico (Fe^{+3}) resultou em maior translocação deste metal para as folhas das plantas de arroz. No entanto, o ferro na forma reduzida (Fe^{+2}) apresentou maior toxidez. O excesso de Fe^{+2} ocasionou reduções drásticas nas taxas fotossintéticas em diferentes cultivares de arroz. A queda fotossintética foi acompanhada pela redução na taxa de transporte de elétrons e aumento na dissipação regulada de energia. Esses parâmetros apresentaram-se sensíveis ao excesso de Fe^{+2} na solução nutritiva de cultivo. A redução na fotossíntese deveu-se a limitações na fixação do carbono pelas plantas de arroz expostas ao excesso de ferro. Danos decorrentes do estresse por Fe^{+2} ocasionaram um reparo ineficiente da proteína D1 do fotossistema II, observado pela diminuição na expressão do gene *OspsbA*. As plantas de arroz aumentaram a expressão do gene *OsFER1* em uma tentativa de minimizar o excesso de ferro nos componentes celulares. Além dos danos fisiológicos, o excesso de ferro afetou a absorção e translocação de outros minerais, reduzindo o teor de P e Mg nas folhas. Os parâmetros fisiológicos de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* mostraram-se sensíveis aos efeitos tóxicos do ferro.

ABSTRACT

MÜLLER, Caroline. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2011. **Photosynthetic response to iron toxicity in different rice cultivars.** Adviser: Marco Antonio Oliva Cano. Co-advisers: Andréa Miyasaka de Almeida and Kacilda Naomi Kuki.

Iron is an essential nutrient for plants. However, the availability of this element to plants varies with soil conditions and crop system. *Oryza sativa* can be cultivated on two different systems: irrigated lowland and upland. In flooded soils, due to anaerobic conditions and low pH, the iron can be reduced becoming highly available. Excessive absorption of iron may cause toxicity in rice plants leading to productivity decrease. Thus, this study aims to establish a relationship among the photochemical, biochemical and molecular mechanisms and energy dissipation system on different rice genotypes allowing a selection of iron tolerant genotypes. The use of ferric citrate (Fe^{+3}) resulted in greater translocation of this metal to the leaves of rice plants. However, the reduced iron (Fe^{+2}) showed a higher toxicity. The excess of Fe^{+2} caused drastic reductions on photosynthetic rates in different rice genotypes. The photosynthetic decrease was accompanied by a reduction of electron transport rate and an increase of regulated energy dissipation. These parameters were also susceptible to excessive Fe^{+2} in the nutrient solution. The reduction on photosynthesis was due to limitations on carbon fixation by rice plants exposed to excessive iron. The damage resulted from the Fe^{+2} stress caused an inefficient repair of photosystem II D1 protein, being observed by a decrease of *OspsbA* gene expression. The rice plants increased *OsFER1* gene expression in an attempt to minimize the iron overload in cellular components. Besides the physiological damage, excessive iron affected the absorption and translocation of other minerals, reducing the P and Mg levels in leaves. The physiological parameters of gas exchange and chlorophyll fluorescence revealed a sensibility to the toxic effects of iron.

INTRODUÇÃO GERAL

O ferro (Fe), nutriente essencial para as plantas, é requerido para processos vitais desde respiração a fotossíntese, onde participa na transferência de elétrons através de reações *redox* reversíveis, alternando entre Fe^{+2} e Fe^{+3} (Kim e Guerinot, 2007). Várias etapas do metabolismo de pigmentos fotossintéticos são dependentes de ferro (Briat *et al.*, 2007). No entanto, o Fe absorvido em excesso induz alterações nos mecanismos fotossintéticos (Spiller e Terry, 1980; Becana *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2001; Souza-Santos *et al.*, 2001; Briat *et al.*, 2007) podendo afetar a produção de cultivares de arroz (Sahrawat, 2005; Fageria *et al.*, 2008; Olaleye *et al.*, 2001, 2009; Audebert e Fofana, 2009).

O Fe apresenta-se no solo aerado em sua forma oxidada (trivalente, Fe^{+3}), a qual é pouco disponível para as plantas (Ponnamperuma, 1972). Desta forma, com a escassez de ferro em solos bem aerados, as plantas desenvolveram duas diferentes estratégias para absorção, transporte e armazenamento deste elemento (Bughio *et al.*, 2002; Ishimaru *et al.*, 2006).

A estratégia I baseia-se na redução do ferro em sua forma férrica (Fe^{+3}) para ferrosa (Fe^{+2}). Inicialmente ocorre uma extrusão de prótons por ATPases presentes nas células epidérmicas radiculares (Hell e Stephan, 2003; Schmidt, 2003). A acidificação do meio aumenta a solubilidade do ferro na rizosfera e consequente redução do Fe^{+3} oxidado para a forma solúvel Fe^{+2} (Kim e Guerinot, 2007), através de enzimas ferro quelato redutase codificadas pelo gene *FRO2* (*Ferric Reductase Oxidase*) (Jeong e Connolly, 2009). Após a redução, o ferro é transportado para o interior da célula por proteínas específicas IRT1 (*Iron Regulated Transporter*) (Eide *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1999; Guerinot, 2000; Varrotto *et al.*, 2002).

Gramíneas em geral utilizam a estratégia II, baseada na quelação do ferro. Essas plantas liberam compostos conhecidos como fitosideróforos (FS), da família dos ácidos muginêicos. Os FS são sintetizados da *L*-metionina via nicotianamina (NA), pela ação das enzimas sintase da nicotianamina (NAS) e transferase da nicotianamina (NAAT) (Shojima *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 1995; Higuchi *et al.*, 1999; Mori, 1999; Curie e Briat, 2003; Inoue *et al.*, 2003; DiDonato Jr *et al.*, 2004; Gendre *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2011). Os FS possuem alta afinidade por Fe^{+3} e se ligam eficientemente ao ferro trivalente na rizosfera. Complexos Fe^{+3} -FS são então

transportados para as raízes das plantas por proteínas transportadoras específicas (Curie *et al.*, 2001; Kim e Guerinot, 2007), codificadas por genes da família YSL (*Yellow Stripe Like*) (Koike *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2009). Os tecidos senescentes também são capazes de remobilizar o ferro para toda a planta via floema (Takahashi, 2003; Takahashi *et al.*, 2003), sugerindo uma provável participação no transporte intra e intercelular de metais em espécies tanto da estratégia I como da II (Kim e Guerinot, 2007). Foram identificados seis genes *NAAT* (Inoue *et al.*, 2008) e três genes *NAS*, dentre os quais apenas *OsNAS1* e *OsNAS2* são expressos nas raízes de arroz (Inoue *et al.*, 2003). Em arroz sob deficiência de Fe, a expressão dos genes *OsNAS* foi observada, ainda, em células que atuam no transporte do mineral à longa distância, evidenciando o papel de *NAS* e *NA* na remobilização do metal na planta (Inoue *et al.*, 2003).

Uma vez absorvido pelas raízes, o ferro é carregado no xilema e translocado até a parte aérea através do fluxo transpiratório (Curie e Briat, 2003). O ferro apresenta-se oxidado quando liberado nos vasos do xilema, sendo transportado na forma de complexos com ácidos orgânicos, especialmente citrato, que é o principal quelante de metais no xilema (Curie e Briat, 2003). A absorção de ferro pelas células do mesofilo também requer uma etapa de redução, após a liberação do íon férrico pela molécula de citrato, sugerindo a existência de um transportador específico de Fe^{2+} localizado na plasmalema das células foliares. O doador de elétrons para a redução do ferro é o NADPH, e esse processo parece ser fortemente induzido pelo aumento na relação NADPH/NADP⁺ resultante da etapa fotoquímica da fotossíntese (Bruggemann *et al.*, 1993). Uma vez no mesofilo, o ferro pode ser armazenado nos vacúolos ou imobilizado pela proteína ferritina (Briat *et al.*, 1995; 2010), a qual ocorre principalmente nos plastídeos (Zancani *et al.*, 2004).

O excesso de ferro na parte aérea pode ocasionar fitotoxicidade e provocar manchas necróticas nas folhas, escurecimento das raízes e inibição do crescimento da planta (Dobermann e Fairhurst, 2000), desbalanço catiônico, ocasionando desordem nutricional (Snowden e Wheeler, 1995). Dentre os nutrientes essenciais, a diminuição na absorção de P, K, Ca e Mg tem sido relatada para cultivares de arroz sensíveis ao excesso de Fe (Silveira *et al.*, 2007). Alguns nutrientes ainda, como o P, são co-regulados pelo Fe (Zheng *et al.*, 2009), podendo apresentar alteração na expressão de genes específicos de P, como *OsP11* (*Oryza sativa Phosphate-limitation*

inducible gene 1) (Wasaki *et al.*, 2003) e *OsPTF1* (*Oryza sativa Pi starvation induced transcription factor 1*) (Yi *et al.*, 2005).

A toxidez por ferro, ainda, potencializa o estresse oxidativo, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, superóxido e radical hidroxila, este último considerado de maior toxidez para a célula (Becana *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2001; Souza-Santos *et al.*, 2001). Têm se observado que *Beta vulgaris* sob toxidez por ferro apresentou alterações na estrutura do cloroplasto, reduzindo o número de grana e lamela estromal por cloroplasto e de tilacóides por grana e ainda o número de moléculas de P₇₀₀ e citocromo *f* por unidade de área (Spiller e Terry, 1980). A desestruturação de pigmentos dos complexos fotossintéticos promove, por sua vez, alteração no transporte de elétrons, ocasionando redução na taxa de assimilação líquida de CO₂ e, com isso, perda da capacidade de fixação de carbono nos cloroplastos (Terry, 1980; Taylor *et al.*, 1982; Scandalios, 1993; Desimone *et al.*, 1996; Mishra e Dubey, 2005).

Para sustentar o crescimento e evitar a toxicidade do ferro celular, as plantas dependem da capacidade de armazenar e remobilizar o ferro (Briat *et al.*, 2007). Em arroz é relatada a ocorrência de duas proteínas da classe das ferritinas, FER1 e FER2 (Gross *et al.*, 2003). A ferritina atua como mecanismo fortemente envolvido na tolerância a esse metal (Majerus *et al.*, 2007) por incorporar o Fe em sua estrutura minimizando, assim, a sua reatividade (Briat e Lobréaux, 1997; Majerus *et al.*, 2009).

O arroz (*Oryza sativa* L.) pode ser cultivado em diferentes sistemas de cultivo: sequeiro, várzea úmida e irrigado. No cultivo de sequeiro a semeadura é feita em solo seco e seu desenvolvimento e produtividade ficam condicionados às condições climáticas. O cultivo em várzea é realizado em solos de várzea úmida drenadas parcialmente, caracterizado pela umidade do solo na zona do sistema radicular das plantas e, em períodos de chuva, o terreno pode ficar temporariamente alagado. O cultivo de arroz irrigado, por sua vez, requer lâmina d'água permanente durante a fase vegetativa até a fase de maturação fisiológica (Dobermann e Fairhurst, 2000). Este terceiro sistema de cultivo corresponde à maior parte da área plantada no mundo e contribui com 75% da produção mundial de grãos de arroz (Azambuja *et al.*, 2004). Durante o alagamento do solo, a difusão do oxigênio atmosférico para o solo é limitada, predispondo o ambiente à hipóxia. Além disso, o oxigênio molecular

dissolvido na água é consumido pelos microorganismos aeróbicos que, com o tempo são substituídos pelos anaeróbios, resultando num ambiente de acúmulo de CO₂ (Sousa *et al.*, 2004; Grotz e Guerinot, 2006). Estes fatores contribuem para a diminuição do pH favorecendo redução de metais originalmente oxidados – como o ferro ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$), disponibilizando-os em altas concentrações para as plantas, o que pode configurar uma situação potencialmente tóxica (Ponnamperuma, 1972; Becana *et al.*, 1998; Becker e Asch, 2005; Sahrawat, 2005; Audebert e Fofana, 2009).

A toxidez por ferro é uma dos mais importantes estresses abióticos que limitam a produção de arroz em cultivo irrigado (Dobermann e Fairhurst, 2000). Assim, a resistência ao excesso de Fe em plantas de arroz pode ser uma consequência de evasão de Fe e/ou tolerância a altas concentrações de Fe interno. Diversos cultivares variam amplamente em sua capacidade de responder ao excesso de Fe. Com isso, tem sido sugerido que a manutenção dos níveis de nutrientes essenciais (Luo *et al.*, 1997), das taxas fotossintéticas, e, principalmente o controle da expressão gênica (Sousa *et al.*, 2004), em condições de excesso de Fe, contribui para caracterizar fenótipos tolerantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Audebert, A.; Fofana, M. (2009) Rice Yield Gap due to Iron Toxicity in West Africa. **Journal of Agronomy & Crop Science** 195: 66-76
- Azambuja, I.H.V.; Venetti Jr., F.J.; Magalhães Jr., A.M. (2004) **Aspectos socioeconômicos da produção de arroz**. In: Gomes, A.S.; Magalhães Jr. (eds.) Arroz Irrigado no Sul do Brasil: Empraba Informação Tecnológica. p. 23-44
- Becana, M.; Moran, J.F.; Iturbe-Ormaetxe, I. (1998) Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil** 201: 137-147
- Becker, M.; Asch, F. (2005) Iron toxicity in rice - conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition Soil Science** 168: 558-573
- Briat J.-F.; Fobis-Loisy, I.; Grignon, N.; Lobreaux, S.; Pascall, N.; Savino, G.; Thoiron, S.; Von Wiren, N.; Wuytswinkel, O. (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. **Biol. Cell** 84:69-81.
- Briat, J.-F.; Curie, C.; Gaumard, F. (2007) Iron utilization and metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 10: 276–282
- Briat, J.-F.; Duc, C.; Ravet, K., Gaymard, F. (2010) Ferritins and iron storage in plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1800: 806-814
- Briat, J.-F.; Lobréaux, S. (1997) Iron Transport and storage in plants. **Trends in Plant** 2: 187-193
- Bruggemann, W.; Maass-Kantel, K.; Moog, P. R. (1993) Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane bound ferric-chelate reductase. **Planta** 190:151-155
- Bughio, N.; Yamaguchi, H.; Nishizawa, N.K.; Nakanishi, H.; Mori, S. (2002) Cloning an iron regulated metal transporter from rice. **Journal of Experimental Botany** 53: 1677-1682
- Curie, C.; Briat, J.F. (2003) Iron transport and signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology** 54: 183-206
- Curie, C.; Panaviene, Z.; Loulergue, C.; Dellaporta, S.L.; Briat, J.-F.; Walker, E.L. (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. **Nature** 409: 346-349
- Desimone, M.; Henke, A.; Wagner, E. (1996) Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. **Plant Physiology** 111: 789-796
- DiDonato Jr, R.J.; Roberts, L.A.; Sanderson, T.; Easley, R.B.; Walker, E.L. (2004) Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine–metal complexes. **The Plant Journal** 39: 403-414

- Dobermann, A.; Fairhurst, T. (2000) Toxicidad de hierro en arroz. *In*: Dobermann, A.; Fairhurst, T. (Eds.). **Rice: nutrient disorders & nutrient management**. Potash and Phosphate Institute and International Rice Research Institute. p. 1-4
- Eide, D.; Broderius, M.; Fett, J.P.; Guerinot, M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **Proceeding of the National Academy Science** 93: 5624-5628
- Fageria, N.K.; Santos, A.B.; Barbosa Filho, M.P.; Guimarães, C.M. (2008) Iron toxicity in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition** 31: 1676-1697
- Fang, W.; Wang, J.; Lin, C.; Kao, C. (2001) Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation** 35: 75-80
- Gendre, D.; Czernic, P.; Conéjéro, G.; Pianelli, K.; Briat, J.-F.; Lebrun, M.; Mari, S. (2006) TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine- Ni/Fe transporter. **The Plant Journal** 49: 1-15
- Gross, J.; Stein, R.J.; Fett-Neto, A.G.; Fett, J.P. (2003) Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology** 26: 477-497
- Grotz, N.; Guerinot, M.L. (2006) Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1763 :595-608
- Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta** 1465: 190-198
- Hell, R.; Stephan, U.W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta** 216: 541-551
- Higuchi, K.; Suzuki, K.; Nakanishi, H.; Yamagushi, H.; Nishisawa, N.K.; Mori, S. (1999) Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. **Plant Physiology** 119: 471-479
- Inoue, H.; Higuchi, K.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2003) Three rice nicotianamine synthase genes, *OsNAS1*, *OsNAS2*, and *OsNAS3* are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron. **The Plant Journal** 36: 366-381
- Inoue, H.; Kobayashi, T.; Nozoye, T.; Takahashi, M.; Kakei, Y.; Suzuki, K.; Nakazono, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2009) Rice *OsYSL15* Is an Iron-regulated Iron(III)-Deoxymugineic Acid Transporter Expressed in the Roots and Is Essential for Iron Uptake in Early Growth of the Seedlings. **The Journal of Biological Chemistry** 284: 3470-3479
- Inoue, H.; Takahashi, M.; Kobayashi, T.; Suzuki, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2008) Identification and localisation of the rice nicotianamine aminotransferase gene *OsNAAT1* expression suggests the site of phytosiderophore synthesis in rice. **Plant Molecular Biology** 66: 193-203
- Ishimaru, Y.; Suzuki, M.; Tsukamoto, T.; Suzuki, K.; Nakazono, M.; Kobayashi, T.; Wada, Y.; Watanabe, S.; Matsushashi, S.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.;

- Nishizawa, N.K. (2006) Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. **The Plant Journal** 45: 335-346
- Jeong, J.; Connolly, E.L. (2009) Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. **Plant Science** 176: 709-714
- Kim, S.A.; Guerinot, M.L. (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. **FEBS Letters** 581: 2273-2280
- Koike, S.; Ionue, H.; Mizuno, D.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2004) *OsYSL2* is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. **The Plant Journal** 39: 415-424
- Luo, A.; Jing, G.; Ni, J.; Jiang, S.; Zhang, Y. (1997) Rice genotype differences in nutrient status under excessive ferric-iron conditions. **Journal of Plant Nutrition** 20: 1361-1373
- Ma, J.F.; Shinada, T.; Matsuda, C.; Nomoto, K. (1995) Biosynthesis of phytosiderophores, mugineic acids, associated with methionine cycling. **The Journal of Biological Chemistry** 270:16549-165554
- Majerus, V.; Bertin, P.; Lutts, S. (2009) Abscisic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. **Plant Soil** 324: 253-265
- Majerus, V.; Bertin, P.; Swenden, V.; Fortemps, A.; Lobréaux, S.; Lutts, S. (2007) Organ-dependent responses of the African rice to short-term iron toxicity: ferritin regulation and antioxidative responses. **Biologia Plantarum** 51: 303-312
- Mishra, S.; Dubey, R.S. (2005) **Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants**. Cap 45. *In*: Pessaraki, M. (ed.) Handbook of Photosynthesis. 2 ed. 862 p.
- Mori, S. (1999) Iron acquisition by plants. **Current Opinion in Plant Biology** 2: 250-253
- Olaleye, A.O.; Ogunkunle, A.O.; Singh, B.N.; Odeleye, F.O. Dada, O.A.; Senjobi, B.A. (2009) Elemental Composition of Two Rice Cultivars under Potentially Toxic on Aquept and Aquent. **Notulae Scientia Biologicae** 1: 46-49
- Olaleye, A.O.; Tabi, F.O.; Ogunkunle, A.O.; Singh, B.N.; Sahrawat, K.L. (2001) Effect of toxic iron concentrations on the growth of lowlands rice. **Journal of Plant Nutrition** 24: 441-457
- Ponnamperuma, F.N. (1972) The chemical of submerged soils. **Advances in Agronomy** 24: 29-96
- Robinson, N.J.; Proctor, C.M.; Connolly, E.L.; Guerinot, M.L. (1999) A ferric chelate reductase for iron uptake from soils. **Nature** 397: 694-697
- Sahrawat, K.L. (2005) Managing iron toxicity in lowland rice: the role of tolerant genotypes and plant nutrients., *In*: Toriyama, K.; Heong, K.L.; Hardy, B. (Eds.). **Rice is life: scientific perspectives for the 21st century**: Proceedings of the World Rice Research Conference. Tsukuba, Japan. pp. 452-454

- Scandalios, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology** 101: 7-12
- Schmidt, W. (2003) Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. **Trends in Plant Science**. 8: 188-193
- Shojima, S.; Nishizawa, N.K.; Tushiya, S.; Nozoe, S.; Trifune, T.; Mori, S. (1990) Biosynthesis of phytosiderophores In vitro by biosynthesis of 2''-deoxymugineic acid from l-methionine and nicotianamine **Plant Physiology** 93:1497-1503
- Silveira, V.C.; Oliveira, A.P.; Sperotto, R.A.; Amaral, L.; Dias, J.F.; Cunha, J.B.; Fett, J.P. (2007) Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 19: 127-139
- Snowden, R.; Wheeler, B.D. (1995) Chemical changes in selected wetland plant species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. **New Phytologist** 131: 503-520
- Sousa, R.O.; Gomes, A.S.; Vahl, L.C. (2004) **Toxidez por ferro em arroz irrigado**. In: Gomes, A.S.; Magalhães Jr. (eds.) Arroz Irrigado no Sul do Brasil: Empraba Informação Tecnológica. p. 305-337
- Souza-Santos, P.; Ramos, R.S.; Ferreira, S.T.; Carvalho-Alves, P.C. (2001) Iron induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta** 1512: 357-366
- Spiller, S.; Terry, N. (1980) Limiting Factors in Photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. **Plant Physiology** 65: 121-125
- Takahashi, M. (2003) Overcoming Fe deficiency by a transgenic approach in rice. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 72: 211-220
- Takahashi, M.; Terada, Y.; Nakai, I.; Nakanishi, H.; Yoshimura, E.; Mori, S.; Nishizawa, N. (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. **Plant Cell** 15: 1263-1280
- Taylor, S.E.; Terry, N.; Huston, R.P. (1982) Limiting Factors in Photosynthesis. III. Effects of iron nutrition on the activities of three regulatory enzymes of photosynthetic carbon metabolism. **Plant Physiology** 70: 1541-1543
- Terry, N. (1980) Limiting Factors in Photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. **Plant Physiology** 65: 114-120
- Varotto, C.; Maiwald, D.; Pesaresi, P.; Jahns, P.; Salamini, F.; Leister, D. (2002) The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal** 31: 589-599
- Wasaki, J.; Yonetani, R.; Shinano, T.; Kai, M.; Osaki, M. (2003) Expression of the *OsP11* gene, cloned from rice roots using cDNA microarray, rapidly responds to phosphorus status. **New Phytologist** 158: 239-248
- Wu, J.; Wang, C.; Zheng, L.; Wang, L.; Chen, Y.; Whelan, J.; Shou, H. (2011) Ethylene is involved in the regulation of iron homeostasis by regulating the expression of iron-acquisition-related genes in *Oryza sativa*. **Journal of Experimental Botany** 62(2): 667-74

Yi, K.; Wu, Z.; Zhou, J.; Du, L.; Guo, L.; Wu, Y.; Wu, P. (2005) *OsPTF1*, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. **Plant Physiology** 138: 2087-2096

Zancani, M.; Peresson, C.; Biroccio, A.; Federici, G.; Urbani, A.; Murgia, I.; Soave, C.; Micali, F.; Vianello, A.; Macri, F. (2004) Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. **European Journal of Biochemistry** 271: 3657-3664

Zheng, L.; Huang, F.; Narsai, R.; Wu, J.; Giraud, E.; He, F.; Cheng, L.; Wang, F.; Wu, P.; Whelan, J.; Shou, H. (2009) Physiological and transcriptome analysis of iron and phosphorus interaction in rice seedlings. **Plant Physiology** 151: 262-274

OBJETIVO GERAL

Estabelecer uma relação entre os mecanismos fotoquímicos, bioquímicos, moleculares e de dissipação de energia em diferentes cultivares de arroz que permitam realizar uma seleção de cultivares tolerantes ao ferro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos de diferentes fontes de Fe sobre a fotossíntese
2. Caracterizar anatomicamente os efeitos de níveis tóxicos do ferro
3. Verificar a ação do ferro em níveis tóxicos sobre a absorção e acúmulo de nutrientes
4. Analisar a expressão diferencial de genes envolvidos na absorção, transporte e homeostase do ferro.
5. Verificar, através de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares, uma possível tolerância à níveis tóxicos de ferro, em cultivares de arroz de diferentes procedências
6. Realizar uma seleção de cultivares possivelmente tolerantes ao ferro, a partir da avaliação de parâmetros fisiológicos analisados de forma univariada e multivariada.

CAPÍTULO 1

ALTERAÇÕES MOLECULARES, ENZIMÁTICAS, FOTOSSINTÉTICAS E ANATÔMICAS EM ARROZ CULTIVADO SOB EXCESSO DE FERRO

1. INTRODUÇÃO

O ferro (Fe) é um micronutriente essencial para as plantas, compondo enzimas envolvidas em reações *redox* importantes para a fotossíntese e respiração (Gross *et al.*, 2003). A disponibilidade desse metal no ambiente, no entanto, está associada ao seu conteúdo no solo, pH, conteúdo de água e de substâncias orgânicas, bem como a associação simbiótica com o sistema radicular (Sousa *et al.*, 2004; Grotz e Guerinot, 2006). Sob condições excessivas Fe, em solos irrigados (Ponnamperuma, 1972), ocorre aumento da disponibilidade deste elemento para as plantas podendo chegar a níveis tóxicos (Fang *et al.*, 2001; Sahrawat, 2005), os quais induzem alterações nos mecanismos fisiológicos (Spiller e Terry, 1980; Fang *et al.*, 2001; Souza-Santos *et al.*, 2001; Briat *et al.*, 2007) podendo levar à perda de produtividade (Sahrawat, 2005; Fageria *et al.*, 2008; Olaleye *et al.*, 2001, 2009; Audebert e Fofana, 2009).

A ocorrência natural do ferro no solo é sob a forma de óxidos trivalentes (Fe(OH)₃) insolúveis e indisponíveis como micronutrientes para as plantas. No entanto, de acordo com a disponibilidade de água no solo, o Fe⁺³ pode ser reduzido a Fe⁺², tornando este metal solúvel e disponível para as plantas. O Fe⁺² pode ser absorvido por transportadores específicos de Fe (Eide *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1999; Guerinot, 2000, Varrotto *et al.*, 2002; Schmidt, 2003; Kim e Guerinot, 2007; Jeong e Connolly, 2009). Os íons Fe³⁺, no entanto, precisam ser quelados à fitosideróforos liberados pelas raízes (Shojima *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 1995; Mori, 1999) para permitir absorção do metal (Curie *et al.*, 2001; Koike *et al.*, 2004, Kim e Guerinot, 2007; Inoue *et al.*, 2009). Para evitar a deficiência de Fe em solos aerados, as plantas de arroz desenvolveram estratégias que permitem absorção de Fe em ambas as formas divalente (Fe⁺²) e trivalente (Fe⁺³) (Bughio *et al.*, 2002; Ishimaru *et al.*, 2006). Isso ocorre uma vez que o cultivo de *Oryza sativa* pode ser conduzido em sistemas distintos: sob alagamento constante, na ausência de alagamento, ou em períodos parciais de retenção de água no solo (Azambuja *et al.*, 2004). Em solos inundados, devido as condições anaeróbicas e de baixo pH, o ferro, inicialmente em sua forma trivalente (Fe³⁺), pode ser reduzido a sua forma divalente (Fe²⁺), altamente disponível (Becana *et al.*, 1998; Sahrawat, 2005).

O ferro, na planta, por sua vez é complexado, no xilema, com ácidos orgânicos como o citrato (Cataldo *et al.*, 1988) e translocado até a parte aérea através do fluxo

transpiratório (Curie e Briat, 2003). Os complexos Fe^{+3} -citrato são, então, reduzidos nas plasmalemas, pelas enzimas ferro redutase oxidase, disponibilizando Fe^{+2} nas células do mesófilo, e liberando o quelante (Bruggemann *et al.*, 1993). O complexo Fe-citrato atua ainda na distribuição do Fe na planta, pelo floema (Curie e Briat, 2003; Hell e Stephan, 2003).

O excesso de ferro no ambiente de cultivo promove desordens nutricionais (Ottow *et al.*, 1983, Genon *et al.*, 1994; Snowden e Wheeler, 1995; Olaleye *et al.*, 2001, 2009; Silveira *et al.*, 2007; Audebert e Fofana, 2009) que podem desfavorecer o equilíbrio fisiológico das plantas. Dentre os nutrientes essenciais, a diminuição na absorção de K, Ca e Mg tem sido relatada para cultivares de arroz sensíveis ao excesso de Fe (Silveira *et al.*, 2007), possivelmente como efeito da inibição da absorção de cátions pelo Fe (Sousa *et al.*, 2004). A toxidez pelo ferro é descrita em plantas de arroz em dosagens superiores a 300 mg kg⁻¹ MS, podendo provocar manchas necróticas nas folhas, escurecimento das raízes e inibição do crescimento da planta (Dobermann e Fairhurst, 2000).

O excesso de ferro na planta pode propiciar a potencialização do estresse oxidativo, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Vansuyt *et al.*, 1997; Becana *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2001; Souza-Santos *et al.*, 2001). O estresse oxidativo pode desencadear danos nos componentes fotossintéticos (Spiller e Terry, 1980; Gallego *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1997; Vansuyt *et al.*, 1997; Suh *et al.*, 2002; Lupinková e Komenda, 2004; Sinha e Saxena, 2006; Nenova, 2009), com conseqüente redução na taxa fotossintética (Terry, 1980; Mishra e Dubey, 2005; Pereira *et al.*, 2008; Pereira, 2009). Alterações anatômicas, como ruptura das células radicular e desestruturação nos componentes celulares ainda são descritas como resultados da toxidez por ferro (Taylor *et al.*, 1984; Sahrawat, 2005; Chen *et al.*, 2006).

Como mecanismo de exclusão de Fe pelas raízes, tem sido descrito a formação da placa de ferro nas raízes de plantas de arroz, a qual é capaz de limitar a absorção de minerais, como o próprio ferro (Howeler, 1973; Snowden e Wheeler, 1995; Batty *et al.*, 2000; Hose *et al.*, 2001; Doran *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009).

Mecanismos de proteção contra a toxidez por ferro no interior das plantas podem envolver mecanismos enzimáticos (Fang *et al.*, 2001) e não-enzimáticos (Vansuyt *et al.*, 1997). Como mecanismos enzimáticos têm se observado o aumento

na atividade das enzimas antioxidantes como a dismutase do superóxido, catalase e peroxidase do ascorbato, as quais atuam na eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Becana *et al.*, 1998). Compostos orgânicos como a glutatona reduzida, α - tocoferóis, ácido ascórbico (Jaleel, 2009), carotenóides (Edge *et al.*, 1997; Krinsky e Yeum, 2003; Smirnoff, 2005; Polyakov *et al.*, 2001), dentre outros, compõem o sistema não enzimático para a neutralização de EROs. Além desses fatores, a compartimentalização em organelas e/ou proteínas específicas é uma etapa importante no metabolismo dos minerais. O armazenamento do Fe pode ocorrer no apoplasto, vacúolos, plastídeos e em proteína especializada denominada ferritina (Murgia *et al.*, 2002; Curie e Briat, 2003; Briat *et al.*, 1995; 2007; 2010), a qual atua na manutenção da homeostase de ferro nas células, como observado em plantas de arroz expostas ao excesso desse metal (Majerus *et al.*, 2009).

Diante do excesso de ferro no meio, as plantas utilizam diferentes estratégias para manutenção do metabolismo e crescimento. Deste modo, a resposta diferencial de dois cultivares de arroz, irrigado e sequeiro, e a sensibilidade desses cultivares à diferentes fontes de ferro foi analisada. Para tal, o objetivo do trabalho foi avaliar a o efeito de diferentes fontes de Fe sobre a fotossíntese; caracterizar anatomicamente os efeitos de níveis tóxicos do ferro; verificar a ação do ferro em níveis tóxicos sobre a absorção e acúmulo de nutrientes e analisar a expressão diferencial de genes envolvidos na absorção, transporte e homeostase do ferro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de cultivo e aplicação dos tratamentos

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), cultivares BR-IRGA 409 (híbrido das linhagens IR 930-2/IR 665-31-2-4) (Cordeiro e Medeiros, 2008) e Canastra (CT 7415-6-5-1-2-B) (Soares *et al.*, 1997), foram desinfestadas com hipoclorito de sódio comercial (10%) por 10 min e germinadas em câmara de crescimento ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$) por 7 dias no escuro e 7 dias com fotoperíodo de 12 h. As plântulas foram transferidas para solução nutritiva de Hoagland (pH 4,0, força total) em mantidas em casa-de-vegetação. O pH foi ajustado a cada dois dias com KOH e HCl e a solução renovada semanalmente.

Após aproximadamente trinta dias, as plantas, no estágio V5 de desenvolvimento fenológico (Counce *et al.*, 2000), foram tratadas com sulfato ferroso (FeSO_4 , 7 mM) com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (p/p), cloreto férrico (FeCl_3 -EDTA, 7 mM) e citrato de ferro III (7 mM), concentração previamente definida (Pereira, 2009). Foi realizado em paralelo um tratamento controle em solução nutritiva com concentrações fisiológicas de ferro (0,019 mM). Cada tratamento foi constituído por quatro repetições, sendo o pH ajustado diariamente a 4,0 e a solução renovada a cada 4 dias. As avaliações foram realizadas após sete dias de exposição ao excesso de ferro.

2.2. Variáveis avaliadas

2.2.1. Composição mineral do material vegetal

Para a quantificação do teor de nutrientes nas folhas e raízes, amostras do material a fresco foram secas e moídas em moinho tipo Wiley. Para eliminar qualquer interferência na quantificação de nutrientes na matéria seca das raízes, estas foram previamente lavadas em solução contendo 3 % de ditionito de sódio (p/v), 0,3 M de citrato de sódio e 1,0 M bicarbonato de sódio (Taylor e Crowder, 1983).

O material vegetal moído foi digerido em 1,5 mL de HNO_3 (*Fisher Trace Metal grade*) concentrado, à 118°C por 4 horas e em seguida diluídas em 16 mL de água analisado por *Thermo Elemental PQ Excell* ICP-MS. A análise da composição mineral foi realizada utilizando a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), de acordo com Lahner *et al.* (2003). O

teor dos minerais (mg kg^{-1}) determinados foram: magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca); ferro (Fe), boro (B), cobalto (Co), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn) e alguns elementos traços como arsênio (As), cádmio (Cd), estrôncio (Sr) e rubídio (Rb).

A partir dos teores de ferro obtidos, calculou-se o acúmulo de Fe nas raízes (AR) (Liu *et al.*, 2008) e na parte aérea (AP) (Abichequer e Bohem, 1998) pela razão entre o conteúdo de ferro na parte aérea (CPA) ou nas raízes (CSR) pelo teor de ferro na planta inteira, como sendo:

$$\text{AR (\%)} = [\text{CSR} / (\text{CPA} + \text{CSR})] * 100$$

$$\text{AP (\%)} = [\text{CPA} / (\text{CPA} + \text{CSR})] * 100$$

2.2.2. Determinação das trocas gasosas

As medições de trocas gasosas foram realizadas em folhas completamente expandidas. As variáveis, taxa de assimilação fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E) e a razão entre concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) foram determinadas por um analisador de gás por infravermelho (IRGA; modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre 8:00 e 11:30 a.m., em casa-de-vegetação, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 (C_a) ($\sim 392 \mu\text{mol mol}^{-1}$), e temperatura ($24 - 28 \text{ }^\circ\text{C}$) e umidade ($53 - 66 \%$) ambiente.

A inibi\u00e7\u00e3o da fotoss\u00edntese em rela\u00e7\u00e3o \u00e0 concentra\u00e7\u00e3o de Fe nas folhas foi avaliada ainda em um segundo experimento, montado nas mesmas condi\u00e7\u00f5es descritas no item 2.1. A coleta do material vegetal para quantifica\u00e7\u00e3o do ferro (ver item 2.2.1) foi realizada logo ap\u00f3s as medi\u00e7\u00f5es da assimila\u00e7\u00e3o líquida de CO_2 (A), entre as 8:00 e 11:30 a.m. nas plantas de arroz expostas, ao longo dos sete dias, \u00e0s diferentes fontes de Fe. A partir dos dados obtidos, curvas de regress\u00e3o exponencial ($y = a^{-b \cdot x}$) foram constru\u00eddas a partir da taxa fotossint\u00e9tica e o teor de ferro nas folhas das plantas de arroz.

2.2.3. Fluoresc\u00eancia da clorofila a e Imagem da fluoresc\u00eancia da clorofila a

As vari\u00e1veis de fluoresc\u00eancia da clorofila a foram obtidas com aux\u00edlio do IRGA (LI-6400xt, LI-COR) na mesma \u00e1rea da folha em que foram realizadas as

medições das trocas gasosas. Para obtenção das imagens da fluorescência da clorofila *a* foi utilizado o fluorômetro modulado Imaging-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Os sinais de fluorescência em todos os pontos da área foliar analisada foram capturados por uma câmera CCD (*Charge Coupled Device*) acoplada ao aparelho a qual forneceu as imagens para o computador (Oxborough, 2004). Para as avaliações as folhas foram adaptadas ao escuro para que os centros de reação estivessem completamente abertos (todos os aceptores primários oxidados) com perda de calor mínima. As variáveis de indução da fluorescência obtidas foram: fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m). A partir desses valores foi obtido o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII), $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Genty *et al.*, 1989). As variáveis da fase lenta de indução da fluorescência foram obtidas seqüencialmente com a aplicação de uma iluminação actínica e um pulso de luz actínica saturante para a determinação das variáveis: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'). A partir desses parâmetros foi possível calcular a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado, $F_0' = F_0 / [(F_m - F_0)/F_m + (F_0/F_m')]$ (Oxborough e Baker, 1997), para o cálculo do coeficiente de extinção fotoquímico pelo modelo *lake*, o qual fornece uma estimativa de centros de reações abertos do FSII, $q_L = (F_m' - F) / (F_m' - F_0') \cdot (F_0'/F)$ (Kramer *et al.*, 2004). O rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no PSII, $Y_{II} = (F_m' - F) / F_m'$; e os rendimentos quântico da dissipação de energia regulada, $Y_{NPQ} = (F/F_m') - (F/F_m)$ e da dissipação de energia não regulada, $Y_{NO} = F/F_m$, foram calculados de acordo com Genty *et al.* (1989) e Hendrickson *et al.* (2004). O Y_{II} foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons, $ETR = Y_{II} \cdot PAR \cdot 0,84 \cdot 0,5$ (Bilger *et al.*, 1995), onde *PAR* é o fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; 0,5 o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996); e, 0,84 o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer, 1981).

2.2.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real (qPCR)

O RNA total foi extraído do material foliar fresco dos cultivares Canastra e BR-IRGA 409 utilizando o reagente Trizol (38 % de fenol ácido pH 4,5, 0,8 M tioceanato de guanidina; 0,4 M tioceanato de amônio; 0,1 M acetato de sódio pH 5,0;

5,0 % glicerol; água livre de RNAases tratada com dietil pirocarbonato, DEPC). Realizou-se uma centrifugação com cloreto de sódio (5 N) e clorofórmio P.A para separação das fases aquosa, contendo RNA, e orgânica, contendo proteínas e DNA. A precipitação do RNA contido na fase aquosa foi realizada com igual volume de isopropanol P.A. Em seguida realizou-se lavagem do RNA com etanol 75 %. Após a extração o RNA foi quantificado em nanocell acoplado ao espectrômetro e analisado em gel de agarose 0,8% (p/v), corado com *red gel*. Para o experimento de qRT-PCR foram utilizadas quatro repetições biológicas com três replicatas técnicas.

A síntese de cDNA foi realizada com 2 µg de RNA total, pré-tratado com 1 µl de DNase (50 U/µL, *Amplification Grade Dnase I*, InvitrogenTM), incubada por 37 °C a 15 min; para retirar os possíveis contaminantes de DNA genômico e para tal foi utilizado o protocolo da Invitrogen seguindo as normas do fabricante. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando o kit SuperScriptTM *First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (InvitrogenTM), realizada em *thermomixer*. O cDNA foi armazenado a -20 °C.

Para a análise de expressão gênica foi utilizado a técnica de PCR em tempo real (StepOnePlusTM Real-Time PCR System, Applied Biosystem), com sistema de detecção de fluorescência mix SYBR Green I (*Applied Biosystems*[®], California, USA). A reação foi realizada utilizando diluição da reação de síntese de cDNA de fita simples, solução contendo os primers (primer direto e inverso, 10 µM), dNTP (5 mM), tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl₂ (50 mM), SYBR Green I (1:10000; Invitrogen), Platinum Taq DNA polimerase (5U/µl), ROX (Invitrogen) e H₂O estéril. As condições de amplificação foram: *hot start* a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C, com temperatura de anelamento entre 58 °C e 60 °C, conforme o T_m do primer, e temperatura de extensão 72 °C. Os valores de Ct foram calculados pelo programa Real Time PCR Miner v 2.2 (Zhao e Fernald, 2005; <http://www.miner.ewindup.info/>) a partir dos valores de fluorescência das reações. Para a normalização dos dados utilizou-se genes constitutivos selecionados pelo programa GeNorm v. 3.5, dentre os genes de *Oryza sativa* actina (*OsACT*), β-1, 3-glucanase (*OsGLU*), tubulina (*OsTUB*) e ubiquitina (*OsUBQ5*). Foram utilizados os métodos comparativos propostos por Zhao e Fernald (2005).

2.2.5. Atividade de enzimas antioxidativas

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações das atividades das catalases (CATs) e das peroxidases do ascorbato (APXs) foram obtidos pela maceração de 0,3 g de tecido vegetal em N₂ líquido, em 2 mL de meio de homogeneização constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8 ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM; e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto *et al.*, 1999). Para a determinação das redutases da glutathiona (GRs) o meio de homogeneização foi composto por tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1 %. O homogenato foi filtrado através de gaze e centrifugado a 12.000 g por 15 minutos, a 4 °C (Peixoto *et al.*, 1999).

A atividade das catalases (CATs, EC 1.11.1.6) foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático foliar, a 2,9 mL de uma meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância a 240 nm, a 25 °C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade das CATs determinada com base na inclinação da reta no intervalo linear, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ de 36 M⁻¹ c⁻² (Anderson *et al.*, 1985) e o resultado expresso em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade das peroxidases do ascorbato (APXs, EC 1.11.1.1) foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), modificado por Koshiba (1993). As alíquotas de 100 µL do extrato enzimático bruto foliar foram adicionados a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM. O decréscimo na absorvância a 290 nm, a 25 °C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade das APXs determinada com base na inclinação da reta no intervalo linear, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do ascorbato de 2,8 mM⁻² cm⁻¹ (Nakano e Asada, 1981) e o resultado expresso em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade das redutases da glutathiona (GRs, EC 1.6.4.2) foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto foliar a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio (0,1 M) pH 7,5, EDTA (1 mM), glutathiona

oxidada (GSSG, 1 mM) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH, 0,1 mM) (tampão Tris-HCl 0,5 mM, pH 7,5), segundo Carlberg e Mannervik (1985). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30 °C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade das GRs determinada com base na inclinação da reta no intervalo linear, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar da coenzima NADP⁺ de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Foyer e Halliwell, 1976) e o resultado expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

O teor de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford.

2.2.6. Caracterização Anatômica Foliar

Para caracterização estrutural, em microscopia de luz, amostras foliares da região mediana foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão cacodilato de sódio (pH 7,2), acrescido de cloreto de cálcio 5 mM (Karnovsky, 1965), por 48 horas, e estocadas em álcool 70%. Posteriormente, foram desidratadas em série etílica e incluídas em historresina Leica (Leica Historesin, Nussloch/Heidelberg, Germany). Cortes transversais (5 μm) foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), sendo corados com azul de toluidina em pH 4,0 e montados em Permout. As observações e documentações fotográficas foram realizadas em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com sistema U-photo, acoplado a uma câmera (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments inc., New York, USA).

2.3. Análise Estatística

O delineamento experimental constituiu-se de blocos ao acaso, com quatro repetições. Os dados de trocas gasosas, fluorescência e expressão gênica foram submetidos à análise de variância e teste de Scott-Knott, 5% de probabilidade, pelo programa SAEG v 9.1. Foram feitas análises de correlações de Pearson, no qual foram identificadas as correlações do mineral ferro e todos os outros minerais pelo programa SAS v 9.0.

3. RESULTADOS

3.1. Teor de ferro, índice de translocação

O aumento na concentração de Fe na solução nutritiva resultou em maiores níveis de Fe nas plantas de arroz. As plantas expostas ao sulfato ferroso (FeSO_4 -EDTA, 7 mM), apresentaram maior acúmulo de ferro nas raízes, em 9,2 e 13,2 vezes em relação às plantas controle, para os cultivares Canastra e BR-IRGA 409, respectivamente (Fig. 1). Ambos os cultivares acumularam 4,2 vezes mais ferro nas raízes, em relação aos respectivos controles, sob cultivo em cloreto férrico (FeCl_3 -EDTA, 7 mM). Para o cultivo em citrato férrico (7 mM), Canastra apresentou acúmulo 3,2 vezes e BR-IRGA 409 6,6 vezes superior aos respectivos controles.

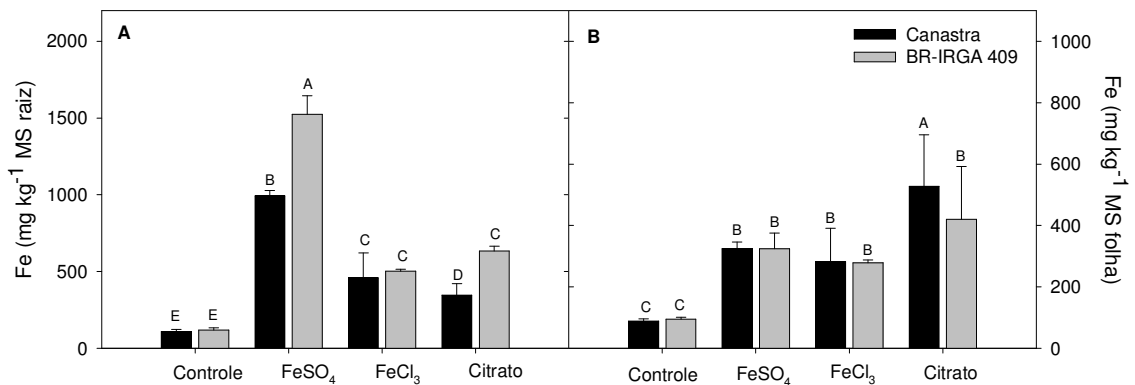


Figura 1. Teor de ferro nas raízes (A) e na parte aérea (B) dos cultivares de arroz Canastra e BR-IRGA 409 submetidas ao FeSO_4 -EDTA (7 mM), FeCl_3 -EDTA (7 mM) e Citrato Férrico (7 mM). Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

O teor de ferro translocado para a parte aérea variou de acordo com as fontes de ferro impostas (Fig. 2). As plantas de arroz submetidas ao sulfato ferroso apresentaram menores índices de translocação de ferro, para ambos os cultivares (~ 21 %), em relação ao teor de ferro total na planta, quando comparado às demais fontes. O cultivo de Canastra, em solução com citrato férrico, proporcionou maior acúmulo de ferro na parte aérea (62 %).

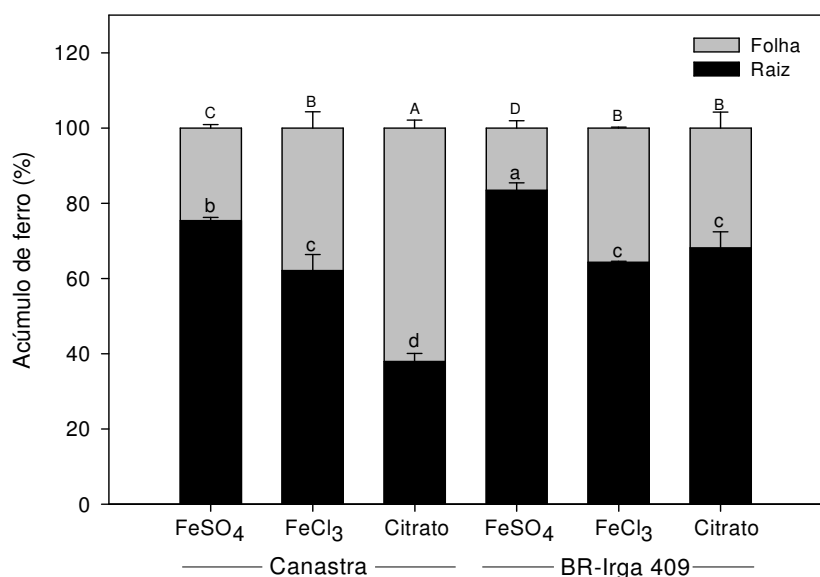


Figura 2. Acúmulo de ferro (%) nas raízes (■) e na parte aérea (□) em cultivares de arroz Canastra e BR-IRGA 409 após sete dias de exposição à diferentes fontes de ferro (7 mM). Barras representam médias ± EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

3.2. Composição Mineral

Os cultivares Canastra e BR-IRGA 409 apresentaram alterações no acúmulo de outros elementos nas raízes (Tab. 1) e nas folhas (Tab. 2) quando cultivados em solução com excesso de ferro. O teor de K, nas raízes, apresentou, de forma geral, correlação negativa com a imposição do excesso de Fe na solução de cultivo. Os elementos Ni e Cu apresentaram correlação positiva com o Fe nas raízes das plantas de arroz. No entanto, o teor de Co apresentou correlação significativa e positiva nas raízes de plantas de arroz expostas apenas ao cloreto férrico e citrato férrico (Tab. 1).

Efeitos mais pronunciados na dinâmica dos nutrientes nas plantas foram observados na parte aérea de cultivares de arroz expostas ao excesso de ferro na solução de cultivo (Tab. 2). Os teores de P, Mn e Rb apresentaram correlação negativa com o Fe nas folhas de arroz em todos os tratamentos. O elemento Ca apresentou menor acúmulo na parte aérea apenas nas plantas cultivadas em sulfato ferroso. Os teores de Na apresentaram correlação positiva com o Fe, independente do tratamento ao passo que, Co e Cu apresentaram correlação positiva e significativa com o Fe apenas nas fontes trivalentes, cloreto férrico e citrato férrico, nas folhas e raízes de arroz (Tab. 2).

Tabela 1. Correlação de Pearson entre o teor de Fe e outros 17 elementos nas raízes de dois cultivares de *Oryza sativa*, cultivados sob excesso de sulfato ferroso (FeSO₄-EDTA, 7 mM), cloreto férrico (FeCl₃-EDTA, 7 mM) e citrato férrico (7 mM), por sete dias, em sistema hidropônico.

RAIZ		B	Na	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd
Canastra	FeSO ₄	0.272 ^{ns}	-0.097 ^{ns}	-0.562 ^{ns}	-0.017 ^{ns}	-0.624 [*]	-0.856 ^{**}	0.063 ^{ns}	-0.266 ^{ns}	0.609 ^{ns}	0.388 ^{ns}	0.700 [*]	0.391 ^{ns}	-0.165 ^{ns}	-0.539 ^{ns}	0.327 ^{ns}	0.116 ^{ns}	0.396 ^{ns}
Canastra	FeCl ₃	0.520 ^{ns}	0.452 ^{ns}	0.786 [*]	0.496 ^{ns}	-0.226 ^{ns}	-0.632 ^{ns}	0.091 ^{ns}	0.672 ^{ns}	0.945 ^{**}	0.986 ^{**}	0.990 ^{**}	-0.453 ^{ns}	-0.204 ^{ns}	-0.307 ^{ns}	0.308 ^{ns}	-0.841 ^{**}	0.192 ^{ns}
Canastra	Citrato	-0.122 ^{ns}	-0.001 ^{ns}	-0.261 ^{ns}	0.081 ^{ns}	-0.170 ^{ns}	-0.760 [*]	-0.544 ^{ns}	-0.512 ^{ns}	0.950 ^{**}	0.943 ^{**}	0.920 ^{**}	-0.090 ^{ns}	-0.072 ^{ns}	-0.481 ^{ns}	0.173 ^{ns}	0.554 ^{ns}	0.272 ^{ns}
IRGA 409	FeSO ₄	0.572 ^{ns}	0.444 ^{ns}	-0.329 ^{ns}	-0.651 ^{ns}	0.158 ^{ns}	-0.751 [*]	0.466 ^{ns}	0.024 ^{ns}	0.174 ^{ns}	0.669 [*]	-0.209 ^{ns}	0.571 ^{ns}	-0.312 ^{ns}	0.203 ^{ns}	0.380 ^{ns}	-0.144 ^{ns}	-0.503 ^{ns}
IRGA 409	FeCl ₃	0.742 ^{ns}	0.685 ^{ns}	0.060 ^{ns}	-0.931 ^{**}	0.652 ^{ns}	-0.754 [*]	-0.101 ^{ns}	0.318 ^{ns}	0.938 ^{**}	0.927 ^{**}	0.962 ^{**}	0.063 ^{ns}	-0.185 ^{ns}	-0.038 ^{ns}	-0.490 ^{ns}	-0.773 [*]	-0.791 [*]
IRGA 409	Citrato	-0.308 ^{ns}	-0.285 ^{ns}	-0.025 ^{ns}	-0.194 ^{ns}	-0.740 ^{ns}	-0.760 ^{ns}	-0.318 ^{ns}	-0.241 ^{ns}	0.929 [*]	0.796 ^{ns}	0.679 ^{ns}	-0.348 ^{ns}	0.074 ^{ns}	-0.059 ^{ns}	-0.552 ^{ns}	-0.270 ^{ns}	-0.780 [*]

* Significativo ao nível de 5 %; ** ao nível 1 % de probabilidade pelo teste t.

Tabela 2. Correlação de Pearson entre o teor de Fe e outros 17 elementos nas folhas de dois cultivares de *Oryza sativa*, cultivados sob excesso de sulfato ferroso (FeSO₄-EDTA, 7 mM), cloreto férrico (FeCl₃-EDTA, 7 mM) e citrato férrico (7 mM), por sete dias, em sistema hidropônico.

FOLHA		B	Na	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd
Canastra	FeSO ₄	0.695 [*]	0.962 ^{**}	-0.907 ^{**}	-0.921 ^{**}	0.764 ^{**}	-0.060 ^{ns}	-0.769 ^{**}	-0.933 ^{**}	0.160 ^{ns}	-0.400 ^{ns}	-0.011 ^{ns}	0.865 ^{**}	0.309 ^{ns}	-0.881 ^{**}	0.284 ^{ns}	-0.887 ^{**}	0.387 ^{ns}
Canastra	FeCl ₃	0.323 ^{ns}	0.967 ^{**}	-0.805 [*]	-0.904 ^{**}	-0.389 ^{ns}	-0.621 ^{ns}	-0.670 ^{ns}	-0.900 ^{**}	0.817 ^{**}	0.612 ^{ns}	0.754 [*]	0.666 ^{ns}	-0.239 ^{ns}	-0.921 ^{**}	-0.136 ^{ns}	-0.892 ^{**}	-0.514 ^{ns}
Canastra	Citrato	0.683 ^{ns}	0.963 ^{**}	-0.505 ^{ns}	-0.889 ^{**}	0.686 [*]	-0.622 ^{ns}	-0.679 ^{ns}	-0.865 ^{**}	0.977 ^{**}	0.876 ^{**}	0.735 [*]	0.270 ^{ns}	0.133 ^{ns}	-0.840 ^{**}	0.081 ^{ns}	-0.653 ^{ns}	-0.842 ^{**}
IRGA 409	FeSO ₄	0.746 [*]	0.845 ^{**}	-0.817 ^{**}	-0.825 ^{**}	0.771 [*]	-0.221 ^{ns}	-0.742 [*]	-0.905 ^{**}	0.337 ^{ns}	-0.144 ^{ns}	-0.586 ^{ns}	0.323 ^{ns}	-0.309 ^{ns}	-0.705 [*]	-0.069 ^{ns}	-0.617 ^{ns}	0.050 ^{ns}
IRGA 409	FeCl ₃	0.680 ^{ns}	0.938 ^{**}	-0.496 ^{ns}	-0.937 ^{**}	0.181 ^{ns}	-0.616 ^{ns}	-0.393 ^{ns}	-0.926 ^{**}	0.887 ^{**}	0.454 ^{ns}	0.982 ^{**}	0.095 ^{ns}	-0.483 ^{ns}	-0.747 [*]	0.112 ^{ns}	-0.875 ^{**}	0.018 ^{ns}
IRGA 409	Citrato	0.429 ^{ns}	0.577 ^{ns}	-0.128 ^{ns}	-0.580 ^{ns}	-0.148 ^{ns}	-0.700 [*]	-0.329 ^{ns}	-0.505 ^{ns}	0.702 [*]	0.632 ^{ns}	-0.590 ^{ns}	-0.272 ^{ns}	-0.264 ^{ns}	-0.744 [*]	0.009 ^{ns}	-0.273 ^{ns}	0.299 ^{ns}

* Significativo ao nível de 5 %; ** ao nível 1 % de probabilidade pelo teste t.

3.3. Trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida do CO₂ (*A*) foi reduzida significativamente para ambos os cultivares em estudo. A redução na taxa fotossintética, foi mais expressiva nas plantas tratadas com FeSO₄ (Fig. 3), sendo mais pronunciada no cultivar Canastra (71 %).

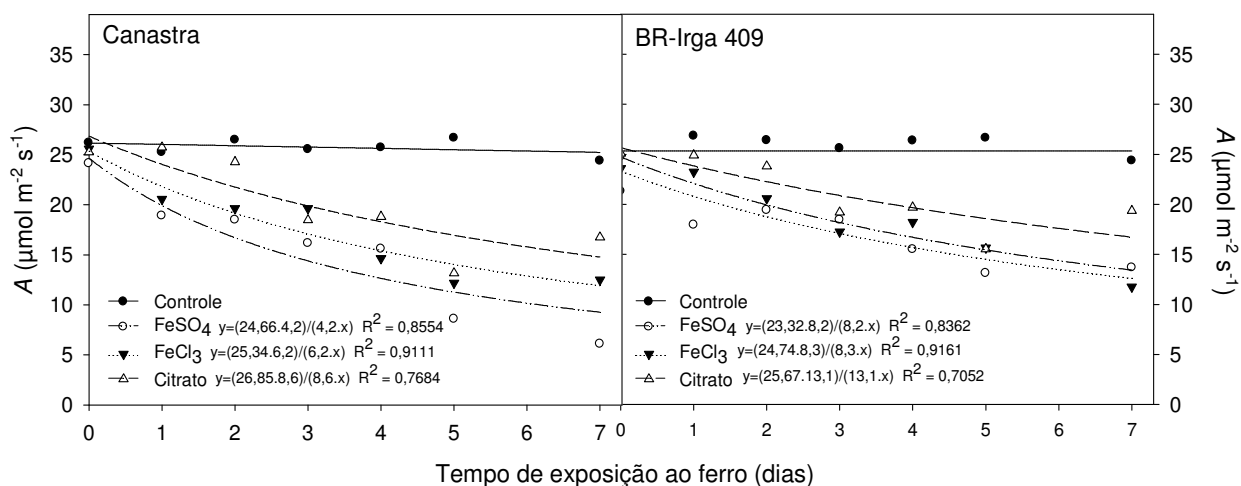


Figura 3. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) em plantas de arroz cultivadas sob excesso de FeSO₄-EDTA (○,---), FeCl₃-EDTA (▼,.....) e Citrato férrico (Δ; ---), ao longo de sete dias. As curvas foram ajustadas por meio de regressões hiperbólicas significativas.

A análise fatorial das trocas gasosas (Tab. 3) apresentou interação significativa para a variável *A*, na qual, a partir do desdobramento, observou-se efeito significativo dos cultivares para a variável “fontes de ferro” fixada e efeito significativo para a fonte de ferro sulfato ferroso dentro dos cultivares. A redução nas taxas fotossintéticas (*A*) foi acompanhada pela diminuição da condutância estomática (*g_s*) e da transpiração (*E*) para ambos os cultivares expostos ao sulfato ferroso e citrato férrico (Tab. 3). No entanto, a exposição das plantas às dosagens tóxicas de ferro aumentou a relação *C_i/C_a*, em média, 17 % sob sulfato ferroso e 13 % em cultivo com cloreto férrico, para os cultivares avaliados.

A partir da relação entre a taxa fotossintética e o acúmulo de ferro na parte aérea das plantas de arroz foi possível observar que o cultivo em solução de citrato férrico apresentou maior velocidade de absorção do metal, em relação às demais fontes (Fig. 4).

Tabela 3. Efeito de níveis tóxicos de ferro sobre as trocas gasosas: *A*, taxa de assimilação líquida de CO₂; *g_s*, condutância estomática; *C_i*, concentração interna de CO₂; *C_i/C_a*, relação entre a concentração interna e ambiente de CO₂ e *E*, transpiração em plantas de arroz, após sete dias de exposição aos tratamentos.

Cultivar	Fonte de Fe	<i>A</i>	<i>g_s</i>	<i>C_i/C_a</i>	<i>E</i>
Canastra	Controle	24,39 ± 0,96	0.561 ± 0,07	0.780 ± 0,031	5.72 ± 0,39
	FeSO ₄ -EDTA	6,09 ± 0,86	0.395 ± 0,12	0.929 ± 0,022	4.02 ± 0,70
	FeCl ₃ -EDTA	12,49 ± 1,78	0.446 ± 0,04	0.855 ± 0,028	5.09 ± 0,34
	Citrato Férrico	16,75 ± 1,92	0.351 ± 0,08	0.749 ± 0,048	4.24 ± 0,58
BR-IRGA 409	Controle	24.36 ± 0,35	0.544 ± 0,10	0.763 ± 0,041	5.74 ± 0,28
	FeSO ₄ -EDTA	13.68 ± 1,02	0.482 ± 0,05	0.857 ± 0,012	4.99 ± 0,08
	FeCl ₃ -EDTA	11.75 ± 0,59	0.570 ± 0,05	0.893 ± 0,008	5.41 ± 0,30
	Citrato Férrico	19.37 ± 0,78	0.368 ± 0,05	0.791 ± 0,048	4.50 ± 0,49

Análise de variância

Fonte de Ferro (Fe)	***	*	**	*
Cultivar (C)	**	*	n.s.	n.s.
Fe x C	**	n.s.	n.s.	n.s.
Bloco	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Canastra x Fe	***			
BR-Irga x Fe	***			
Controle x G	n.s.			
FeSO ₄ -EDTA x C	**			
FeCl ₃ -EDTA x C	n.s.			
Citrato Férrico x C	n.s.			

Média ± EP. Interação (Fe x C) significativa (A) foi seguida de desdobramento fixando as fontes de ferro e posteriormente os cultivares. Nível de significância: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) ; n.s. (não significante).

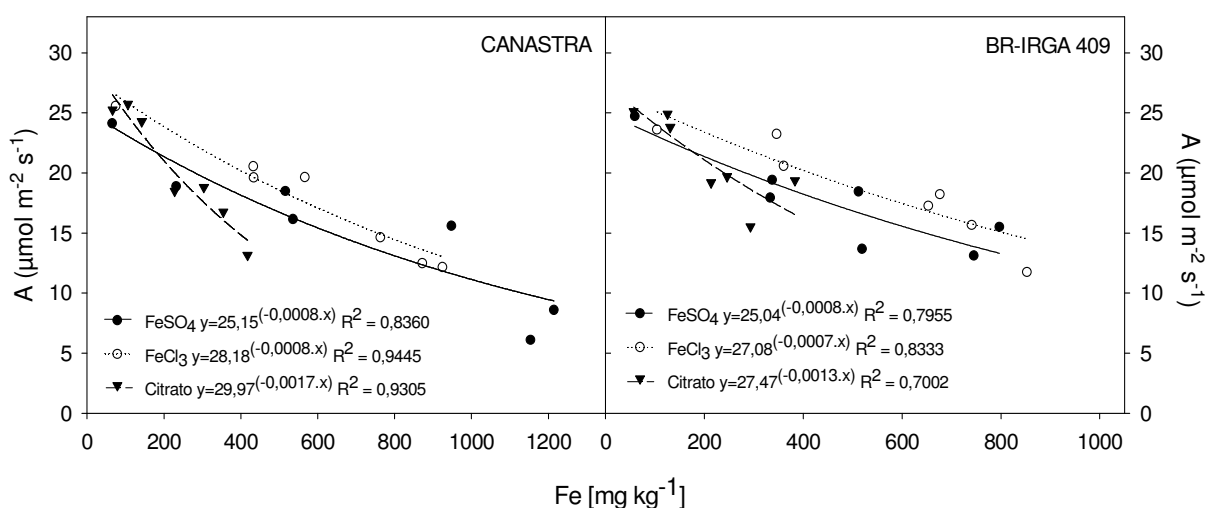


Figura 4. Taxa fotossintética em relação ao acúmulo de ferro (mg kg^{-1} MS) nas folhas de plantas de arroz cultivadas sob excesso de FeSO₄-EDTA (●, —), FeCl₃-EDTA (○,) e Citrato férrico (▼; ----), ao longo de sete dias. As curvas foram ajustadas por meio de regressões exponenciais significativas.

3.4. Fluorescência da clorofila *a*

As plantas de arroz expostas ao excesso de ferro, sob diferentes fontes, não apresentaram alterações significativas na fluorescência basal (F_0) e no rendimento quântico máximo do fotossistema II (FSII; F_v/F_m) (Figs. 5, 7 e 8). A taxa de transporte de elétrons do FSII, ETR, apresentou uma redução significativa nos cultivares avaliados cultivados em diferentes fontes de ferro. O cultivar Canastra teve a ETR reduzido em 57 %, 32 % e 19 % sob exposição de sulfato ferroso, cloreto férrico e citrato férrico, respectivamente. O ETR foi significativamente diminuído no cultivar BR-IRGA 409 quando cultivado em sulfato ferroso (31 %) e cloreto férrico (41 %). O coeficiente de extinção fotoquímica (q_L), o qual estima o centro de reações abertos do FSII, foi reduzido nos cultivares Canastra (43 %) e BR-IRGA 409 (18 %) cultivados em sulfato ferroso; e, em média, 23 % no cultivar BR-IRGA 409 sob cultivo em cloreto férrico. O efeito no q_L foi observado também através da alteração na coloração da imagem da fluorescência da clorofila *a*, do amarelo para alaranjado escuro (Figs. 7 e 8).

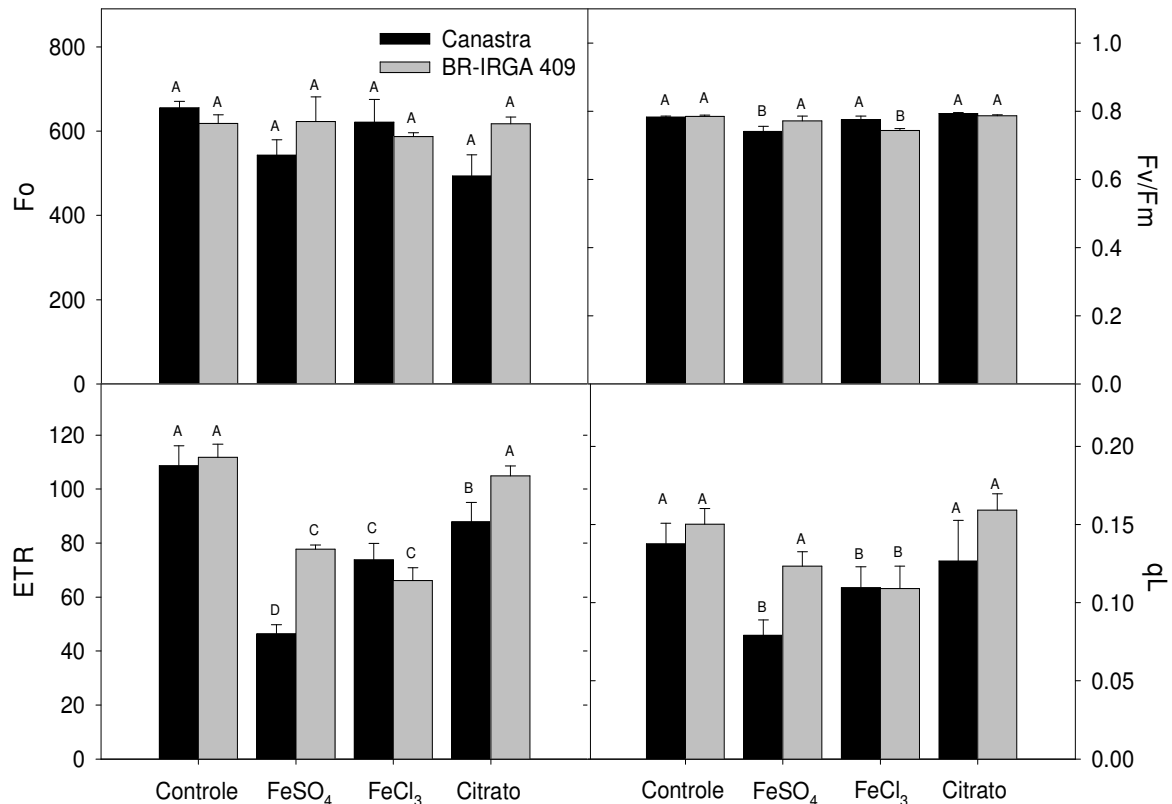


Figura 5. Fluorescência mínima (F_0), rendimento quântico máximo do FSII (F_v/F_m), taxa de transporte de elétrons (ETR) e coeficiente de extinção fotoquímica (q_L) em dois cultivares de arroz expostos a diferentes fontes de ferro (7 mM). Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

O rendimento quântico de conversão fotoquímica de energia no FSII (Y_{II}) reduziu significativamente nos cultivares Canastra e BR-IRGA 409 em resposta ao excesso de diferentes fontes de ferro. A diminuição do Y_{II} foi de até 57 % no cultivar Canastra exposto ao sulfato ferroso (Figs. 6), podendo ser observada pela alteração na imagem da fluorescência da clorofila *a* do tom verde para a coloração amarela/alaranjada (Figs. 7 e 8). As reduções no Y_{II} ocorreram em resposta ao aumento significativo nos níveis do rendimento quântico regulado da dissipação de energia no FSII (Y_{NPQ}) em ambos os cultivares. Foi possível observar incremento em 82 % e 52 % no Y_{NPQ} para os cultivares Canastra e BR-IRGA 409, respectivamente, cultivados em sulfato ferroso. Sob exposição à toxidez por cloreto férrico, Y_{NPQ} apresentou aumento de 65 % no cultivar Canastra e de 37 % no BR-IRGA 409. A fonte de ferro citrato férrico ocasionou um aumento de Y_{NPQ} , em média, 38 % para ambos os cultivares avaliados. O rendimento quântico não regulado da dissipação de energia no FSII (Y_{NO}) não foi afetado significativamente pelo excesso de ferro imposto aos cultivares de arroz.

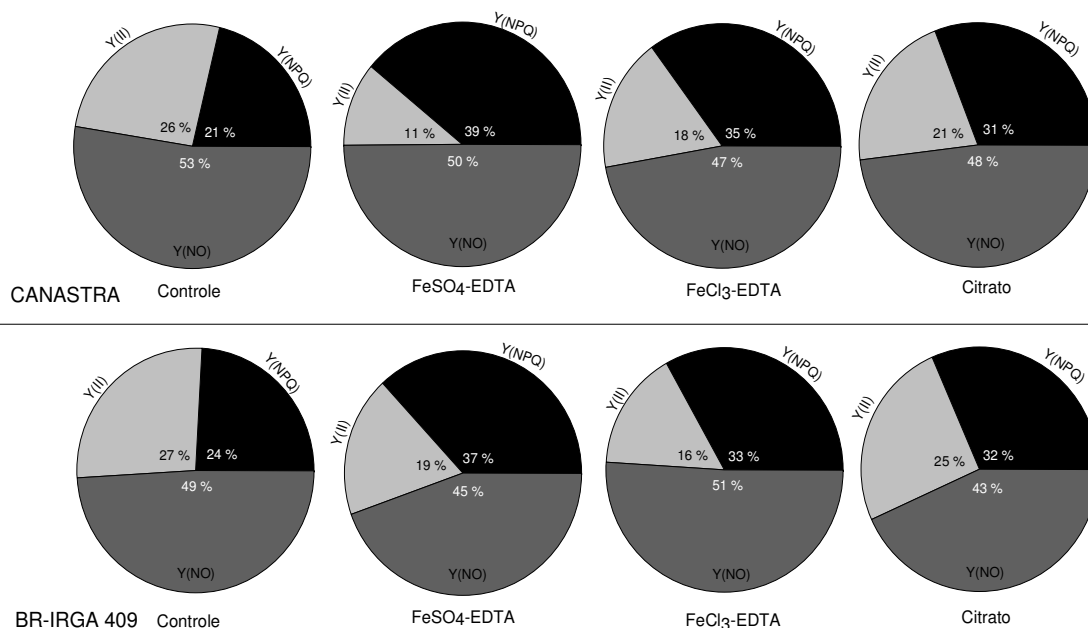


Figura 6. Rendimento quântico de conversão fotoquímica de energia no FSII (Y_{II}), rendimento quântico regulado (Y_{NPQ}) e não regulado (Y_{NO}) da dissipação de energia no FSII de dois cultivares de arroz expostos a diferentes fontes de ferro (7 mM).

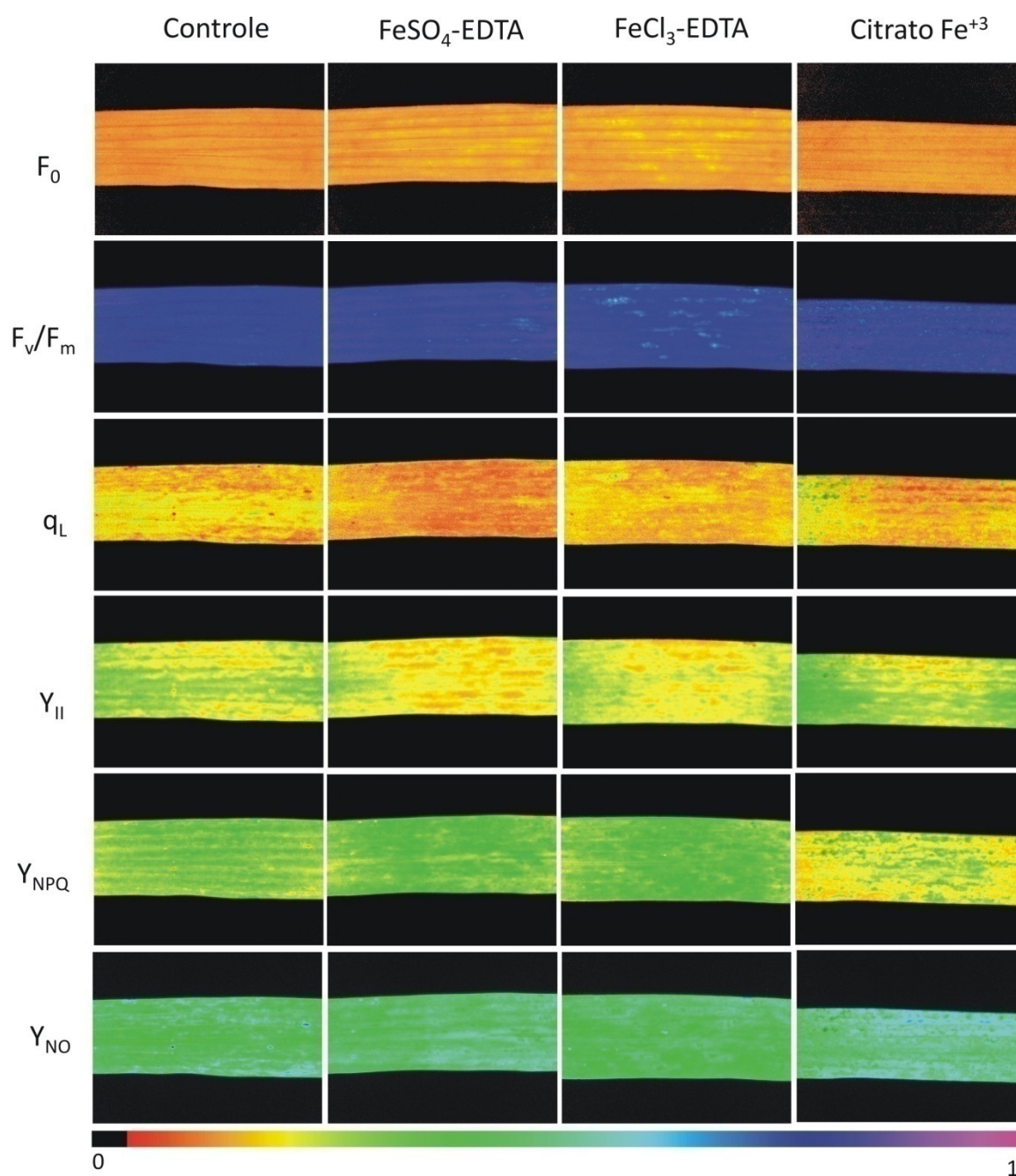


Figura 7. Imagens da fluorescência da clorofila *a* da fluorescência mínima (F_0), rendimento quântico máximo do FSII (F_v/F_m), coeficiente de extinção fotoquímico (q_L), rendimento quântico de conversão fotoquímica de energia no FSII (Y_{II}) e rendimentos quânticos regulado (Y_{NPQ}) e não regulado (Y_{NO}) da dissipação de energia no FSII do cultivar Canastra, exposto a diferentes fontes de ferro (7 mM). A escala de cor, abaixo das imagens, corresponde aos valores de 0 (preto) a 1 (rosa).

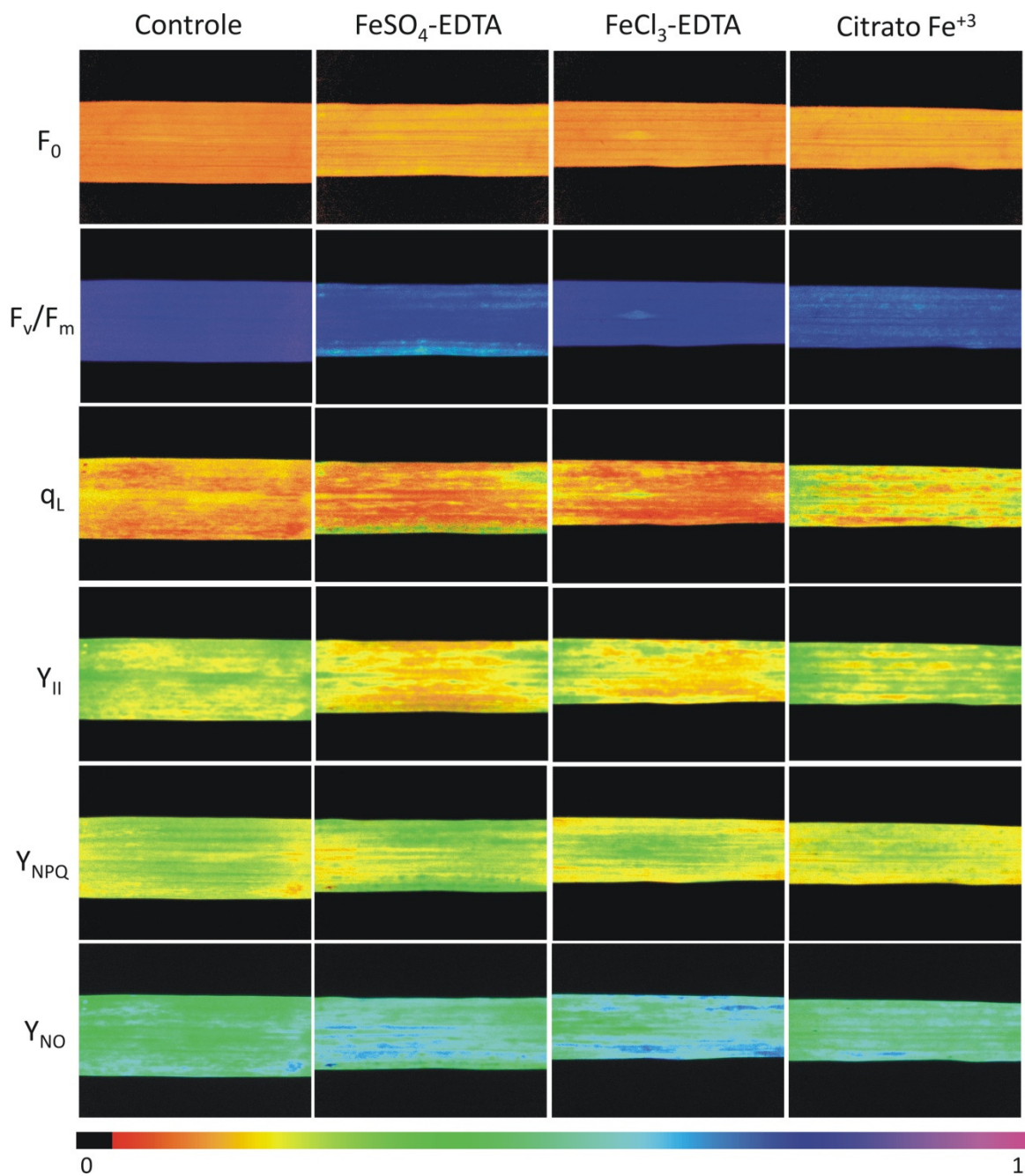


Figura 8. Imagens da fluorescência da clorofila *a* da fluorescência mínima (F_0), rendimento quântico máximo do FSII (F_v/F_m), coeficiente de extinção fotoquímico (q_L), rendimento quântico de conversão fotoquímica de energia no FSII (Y_{II}) e rendimentos quânticos regulado (Y_{NPQ}) e não regulado (Y_{NO}) da dissipação de energia no FSII do cultivar BR-IRGA 409, exposto a diferentes fontes de ferro (7 mM). A escala de cor, abaixo das imagens, corresponde aos valores de 0 (preto) a 1 (rosa).

3.5. Expressão gênica

O nível relativo de mRNA de genes de arroz relacionados a homeostase do ferro (ferritina, *OsFER1*); codificação de proteínas D1 do fotossistema II (proteína Q-B cloroplastídica, *OspsbA*); sintetase da glutamina citosólica (*OsGSI*); precursor de fitosideróforos (sintetase da nicotianamina, *OsNAS1*); transportador de Fe-FS (*Yellow Stripe 1 Like*, *OsYSL1*) e transportadores de fosfato (transportador de monossacarídeo do tonoplasto induzível por limitação de fosfato 1, *OsP11*; fator transcricional bHLH induzível por limitação de fosfato 1, *OsPTF1*) foram avaliados em folhas dos cultivares Canastra e BR-IRGA 409. Dentre os quatro genes constitutivos analisados, actina (*OsACT*), sintetase da glutamina citosólica (*OsGLU*), ubiquitina 5 (*OsUBQ5*) e tubulina (*OsTUB*), os genes *OsUBQ5* e *OsTUB* foram utilizados para os cálculos de expressão, de acordo com a pré-análise realizada no programa GeNorm.

Os cultivares de arroz Canastra e BR-IRGA 409 apresentaram alto nível de expressão do gene *OsFER1*, quando cultivadas em diferentes fontes excessivas de ferro (Tab. 4). O cultivar Canastra apresentou incremento em 46, 30 e 18 vezes no nível de expressão do gene *OsFER1* cultivado em sulfato ferroso, cloreto férrico e citrato férrico, em relação ao controle, respectivamente. O incremento na expressão do gene *OsFER1*, no cultivar BR-IRGA 409, sob as diferentes fontes de ferro, foi em média, 69 vezes superior ao controle. A expressão do gene *psbA* foi aumentada em duas vezes, em relação ao controle, em ambos os cultivares, expostos ao citrato férrico e, ao cloreto férrico, apenas para o cultivar BR-IRGA 409 (Tab. 4).

Os níveis de mRNA de *OsGSI* apresentou níveis 3,8 vezes superior ao controle no cultivar Canastra exposto ao sulfato ferroso e 5,6 vezes no cultivar BR-IRGA 409 cultivado em cloreto férrico. A expressão dos transportadores de fosfato, *OsP11* apresentaram expressão duas vezes maior que os controles nos cultivares Canastra e BR-IRGA 409 cultivados em sulfato ferroso (Tab. 4). O gene do *OsPTF1*, transportador de fosfato, não foi alterado nos cultivares de arroz em estudo. O gene *OsYSL1* apresentou incremento nos níveis de expressão relativa em 3,4 vezes para o cultivar Canastra e 2,2 vezes no cultivar BR-IRGA 409 quando expostos a dosagens tóxicas de sulfato ferroso. O gene *OsNAS1* não foi expresso nas folhas de arroz.

Tabela 4. Análises por qRT-PCR do nível relativo de mRNA, em folhas, dos genes da ferritina (*OsFER1*), proteína Q-B cloroplastídica (*OspsbA*), sintetase da glutamina citosólica (*OsGS1*), transportador de monossacarídeo do tonoplasto induzível por limitação de fosfato 1 (*OsPII*), fator transcricional bHLH induzível por limitação de fosfato 1 (*OsPTF1*), *Yellow Stripe Like 1* (*OsYSL1*), dos cultivares Canastra e BR-IRGA 409 de *Oryza sativa*, cultivados em diferentes fontes de ferro (7 mM), por sete dias.

Genótipo	Fonte de Fe	Nível Relativo de mRNA					
		<i>OsFER1</i>	<i>OspsbA</i>	<i>OsGS1</i>	<i>OsPII</i>	<i>OsPTF1</i>	<i>OsYSL1</i>
Canastra	Controle	1,70 ± 0,42	24,30 ± 2,33	0,392 ± 0,035	4,95 ± 1,43	14,32 ± 3,31	0,73 ± 0,15
	FeSO ₄	78,38 ± 5,68	37,22 ± 1,52	1,473 ± 0,136	8,89 ± 1,65	4,77 ± 0,35	2,45 ± 0,49
	FeCl ₃	50,41 ± 2,45	29,84 ± 1,68	1,136 ± 0,193	4,81 ± 0,70	9,19 ± 2,41	0,86 ± 0,08
	Citrato	29,94 ± 2,21	62,18 ± 12,6	0,512 ± 0,014	6,29 ± 0,12	10,58 ± 3,53	1,49 ± 0,18
BR-IRGA 409	Controle	1,11 ± 0,19	34,37 ± 2,63	0,827 ± 0,037	3,78 ± 0,43	8,55 ± 2,47	1,44 ± 0,18
	FeSO ₄	70,75 ± 16,4	54,16 ± 7,03	2,179 ± 0,103	7,84 ± 0,97	12,30 ± 4,23	3,14 ± 0,63
	FeCl ₃	85,72 ± 8,96	89,69 ± 11,4	4,594 ± 0,518	6,28 ± 0,26	11,50 ± 0,74	3,29 ± 0,46
	Citrato	74,79 ± 15,8	73,66 ± 15,0	1,224 ± 0,150	6,81 ± 0,32	5,72 ± 1,11	1,22 ± 0,23

Nível relativo de expressão gênica normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos ubiquitina5 e tubulina. Médias representam n=4 com três replicatas técnicas ± EP.

3.6. Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos para ambos os cultivares (Fig. 9), após sete dias de exposição às fontes tóxicas de ferro. O cultivar Canastra, no entanto, apresentou um padrão de atividade da APX superior ao cultivar BR-IRGA 409.

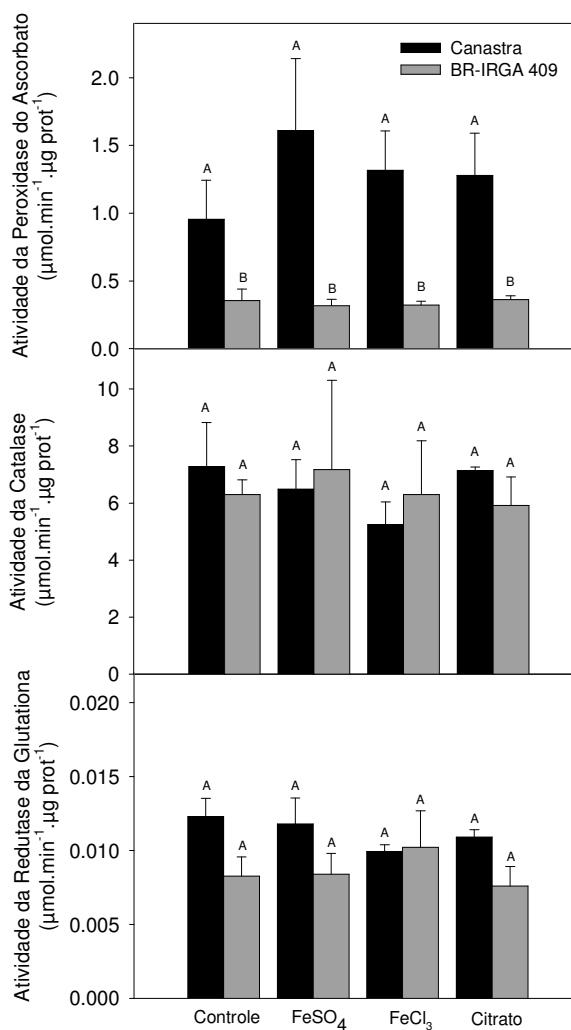


Figura 9. Atividade das peroxidases do ascorbato (APXs), catalases (CATs) e redutases da glutaciona (GRs) nas folhas de dois cultivares de arroz expostos a diferentes fontes de ferro (7 mM). Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

3.7. Sintomas visuais e caracterização foliar da fitotoxidez

Os sintomas de toxidez por ferro foram observados a partir do terceiro dia de exposição às diferentes fontes de ferro. Inicialmente ocorreu bronzeamento na região apical das folhas, apresentando-se mais intenso na região subapical e se expandindo em direção à região mediana das folhas, com o aumento do tempo de exposição aos tratamentos. Após sete dias de exposição às diferentes fontes de ferro observou-se bronzeamento seguido de necrose nas folhas de ambos os cultivares, com maior intensidade para as plantas cultivadas em sulfato ferroso (Fig. 10).

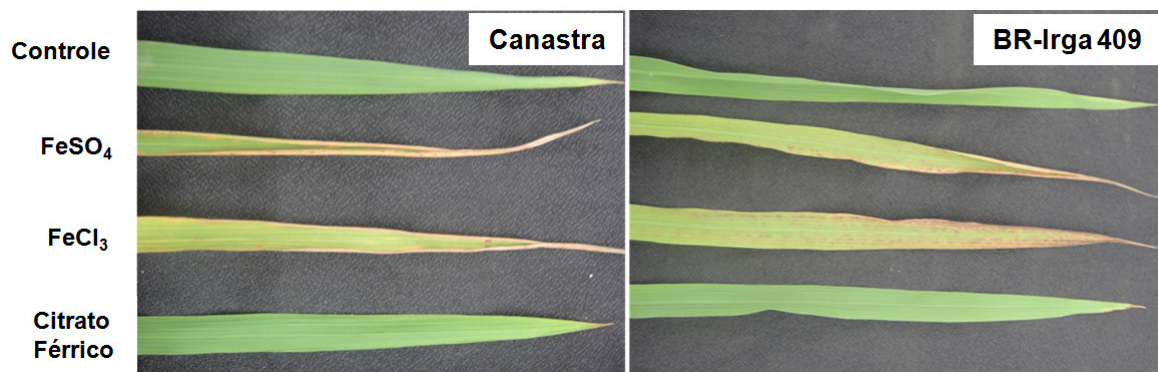


Figura 10. Folhas de arroz após sete dias de exposição a 0,019 mM de FeSO₄-EDTA (Controle) e FeSO₄-EDTA, FeCl₃-EDTA e Citrato férrico (7 mM).

Ambos os cultivares apresentaram danos celulares mais evidentes quando tratados com o sulfato ferroso. Com o desenvolvimento do bronzeamento na região subapical da folha, houve colapso celular seguido de necrose, não havendo distinção nos conteúdos celulares (Figs. 11C-D e 12C-D). As injúrias nas células da epiderme e do parênquima clorofiliano causaram drástica redução na espessura do mesofilo (Figs. 11C-H e 12C-H), em comparação com as plantas controle (Figs. 11A-B e 12A-B).

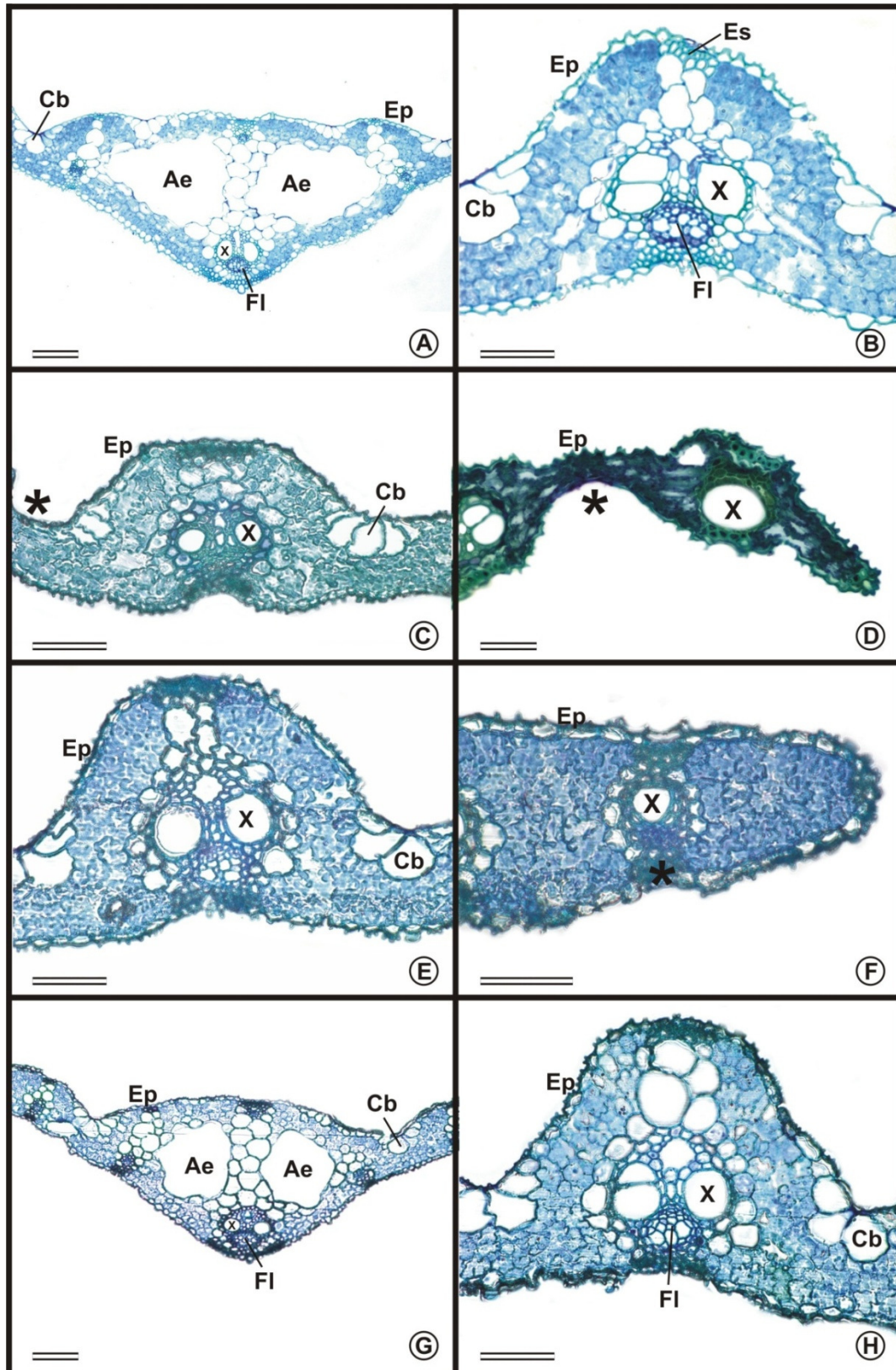


Figura 11. Estrutura foliar de *Oryza sativa* cultivar Canastra em microscopia de luz. Tratamento controle (A e B), tratamento com sulfato ferroso 7 mM (C e D), tratamento com cloreto férrico 7 mM (E e F) e tratamento com citrato férrico 7 mM (G e H). Nervura principal (A e G), nervura de terceira ordem (B, C, E e H) e região do bordo (D e F). Legendas: (Cb) células buliformes, (Ae) aerênquima (Ep) epiderme, (X) xilema, (FI) floema, (Es) esclerênquima, (*) tecido desidratado e colapsado. Barras: 100 μ m (A e G) e 50 μ m (B-F e H).

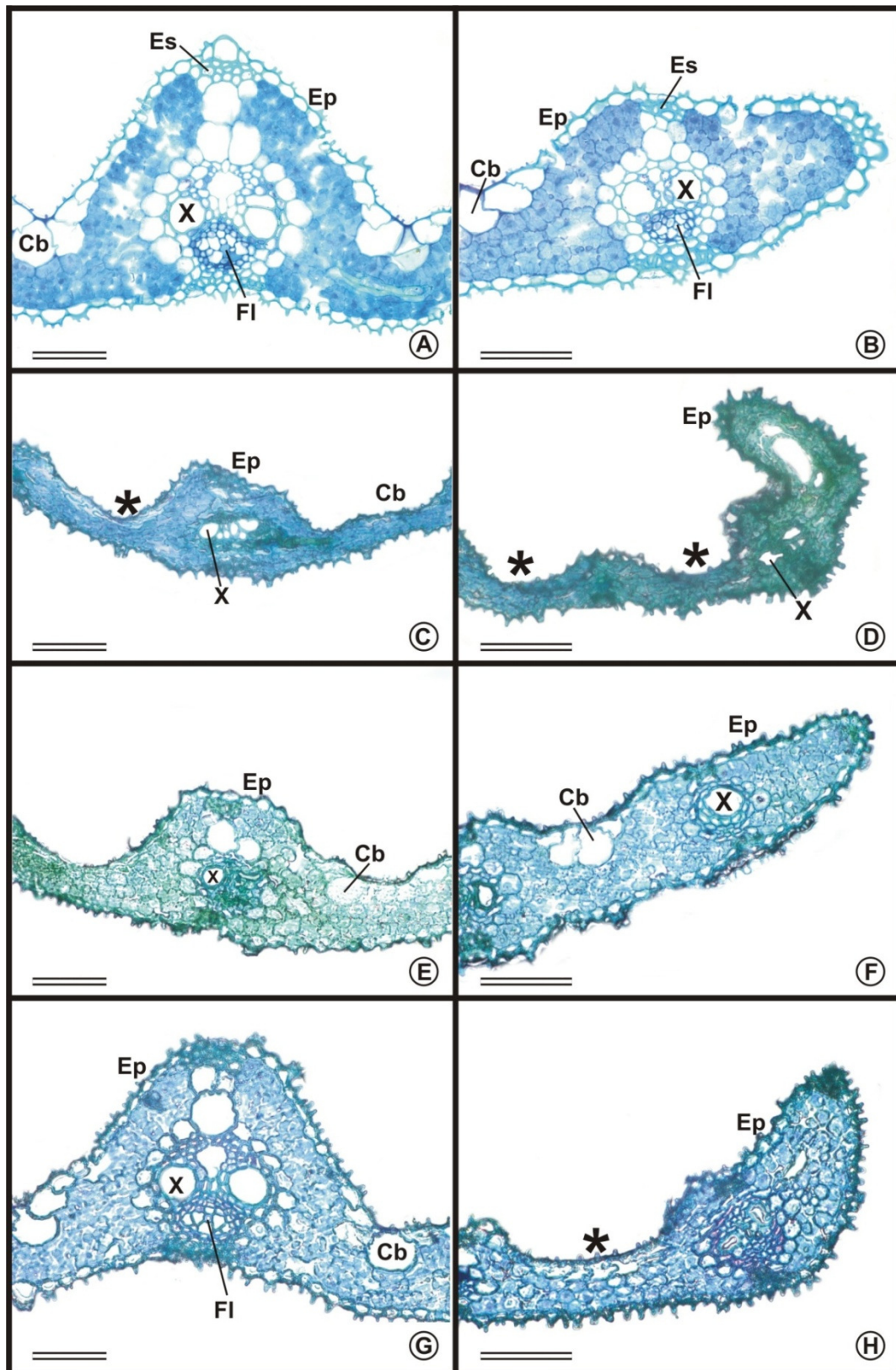


Figura 12. Estrutura foliar de *Oryza sativa* cultivar BR-IRGA 409 em microscopia de luz. Tratamento controle (A e B), tratamento com sulfato ferroso 7 mM (C e D), tratamento com cloreto férrico 7 mM (E e F) e tratamento com citrato férrico 7 mM (G e H). Nervura de terceira ordem (A, C, E e G) e região do bordo (B, D, F e H). Legendas: (Cb) células buliformes, (Ep) epiderme, (X) xilema, (FI) floema, (Es) esclerênquima, (*) tecido desidratado e colapsado. Barras: 50 µm (A- H).

4. DISCUSSÃO

A toxidez por ferro (Fe), nos cultivares Canastra e BR-IRGA 409, ocasionou alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas às plantas de arroz, a qual foi observada visualmente a partir do terceiro dia, com sintoma característico de bronzeamento (Genon *et al.*, 1994; Yamauchi e Peng 1995). O bronzeamento é causado pelo aumento do teor de polifenol oxidado em folhas com elevados teores de Fe (Thipyapong *et al.*, 2004). A toxidez pelo ferro é descrita em dosagens superiores a 300 mg kg⁻¹ MS (Dobermann e Fairhurst, 2000), o que foi observado nas plantas de arroz cultivadas em diferentes fontes de Fe.

O acúmulo tóxico de ferro nas raízes dos cultivares de arroz, cultivados principalmente em sulfato ferroso (Fig. 1), pode ter ocorrido devido à manutenção da solubilidade e disponibilidade do ferro em sua forma divalente (Becana *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2001; Sahrawat, 2005; Kim e Guerinot, 2007). A adição de EDTA, por outro lado, minimizou a reoxidação do ferro e formação da placa férrica (Taylor *et al.*, 1984; Snowden e Wheeler, 1995), a qual poderia limitar a absorção de nutrientes, inclusive do Fe. As plantas de arroz cultivadas com cloreto férrico (FeCl₃), ainda, apresentaram um menor acúmulo de ferro nas raízes, uma vez que Fe⁺³ requer redução ou complexação do metal a fitosideróforos para possibilitar a sua absorção (Fox e Guerinot, 1998).

É possível que a maior velocidade de absorção de ferro (Fig. 4), com maior índice de translocação (Fig. 2) esteja relacionada com a disponibilidade de citrato férrico no meio de cultivo, mais evidenciado no cultivar Canastra. O citrato é um ácido orgânico que atua complexando o Fe⁺³ a fim de auxiliar o transporte de ferro para as células do mésofilo, onde o complexo é reduzido e o ferro liberado (Cataldo *et al.*, 1988). Sob cultivo de sequeiro, o ferro encontra-se na forma de óxidos de ferro trivalente (Fe⁺³), insolúveis e não disponíveis como micronutrientes às plantas (Dobermann e Fairhurst, 2000). Assim as plantas apresentam estratégias que envolvem reações de complexação e redução do ferro na rizosfera para suprirem suas necessidades. O que, como carga genética imposta, pode justificar a maior translocação de ferro no cultivar Canastra, mesmo sob condição simulada de alagamento, como a estabelecida no presente trabalho. Apesar da maior translocação de ferro pelas plantas cultivadas em citrato férrico, este se mostrou menos tóxico em relação ao cultivo em sulfato ferroso. Uma vez que o citrato auxilia o transporte de ferro, esse poderia não estar sendo liberado na parte aérea das plantas de arroz, ou ainda poderia estar promovendo uma exclusão apoplástica. O Fe

potencialmente tóxico, Fe^{+2} , após ser liberado do citrato, poderia ser oxidado no apoplasto e assim prevenir a entrada no simplasto, por um possível mecanismo de exclusão apoplástica de Fe (Engel, 2009). O acúmulo de Fe nas raízes das plantas de arroz foi superior (em média, duas vezes) ao teor desse elemento nas folhas dos cultivares de arroz avaliados (Fig. 1). Fato este demonstra a possível ativação de mecanismos para evitar o transporte excessivo de ferro para a parte aérea, o que poderia vir a comprometer ainda mais seu desempenho fisiológico.

A absorção excessiva de ferro promoveu alteração na composição mineral das plantas de arroz. O acúmulo de K nas raízes das plantas de arroz foi significativamente reduzido em ambos os cultivares, independente da fonte imposta (Tab. 2) se, no entanto, promover menor acúmulo deste mineral na parte aérea (Tab. 1). A manutenção de K em níveis ideais nas folhas é importante uma vez que o K é necessário para a síntese de proteínas e ativação enzimática, podendo afetar a síntese da rubisco nos cloroplastos (Marschner, 1995). O distúrbio nutricional, no entanto, pode prejudicar a oxidação das raízes de arroz e conduzir a maior susceptibilidade à toxicidade de ferro (Tanaka *et al.*, 1966). Os elementos Cu e Ni apresentaram, em geral, correlação negativa com o Fe em todos os tratamentos. O Cu^{+2} , dentre outros elementos pode ser imobilizado por compostos reduzidos, como o enxofre, em solos (Greenland e Datta, 1985). O Co apresentou correlação significativa e positiva nas raízes de plantas de arroz expostas ao cloreto férrico e citrato férrico (Tab. 2). O ferro, na forma trivalente é absorvido complexado a fitosideróforos, como o ácido muginêico (Ishimaru *et al.*, 2006). O complexo ácido muginêico- Fe^{+3} é estruturalmente análogo ao complexo Co^{+3} (Mino *et al.*, 1983), o que pode gerar um sinergismo na absorção de Fe e Co pelas plantas cultivadas com excesso de ferro trivalente.

O acúmulo de vários nutrientes na parte aérea foi afetado pelo excesso de ferro na solução. O Na apresentou correlação positiva com o Fe ao passo que P, Mn e Rb apresentaram correlação negativa e significativa, independente das fontes de Fe e cultivar avaliados (Tab. 1). Tem sido relatado decréscimo no teor de P nas folhas de arroz cultivado sob excesso de Fe, sugerindo que ocorre uma limitação na translocação do P do apoplasto para o simplasto (Silveira *et al.*, 2007). O acúmulo de ferro observado em plantas deficientes em P é, ainda, acompanhado pela indução de transcrição, principalmente nas folhas, de genes relacionados com a homeostase (*NAS3*) ou armazenamento (*FER1*) de ferro (Hirsch *et al.*, 2006). Isso poderia sustentar evidência à co-regulação dos transportadores de P e Fe (Hirsch *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2009).

O decréscimo no teor de P na parte aérea possivelmente desencadeou uma resposta de indução na expressão de transportadores de P, como observado pelo aumento da expressão do *OsP11*, nos cultivares de arroz expostos ao sulfato ferroso (Tab. 4). O aumento na expressão desse transportador é importante na manutenção do crescimento e desenvolvimento das plantas uma vez que esse nutriente é essencial nas taxas de reações fisiológicas em células vegetais, atuando na regulação do processo de metabolismo do açúcar (Giaquinta, 1980) e particionamento de carbono (Khamis *et al.*, 1990) além de servir como um dos substratos primários da fotossíntese (Plesnicar *et al.*, 1994).

Sob cultivo com sulfato ferroso, o Zn e o B apresentaram correlação positiva com o Fe. O íon ferroso é transportado para o interior das células radiculares por transportadores IRT, capazes também de mediar o transporte de outros minerais, dentre os quais, o Zn (Grotz e Guerinot, 2006). Desta forma, outras espécies de ambiente irrigado, cultivadas sob excesso de Fe e Zn, separadamente, apresentaram boa correlação entre a tolerância a Zn e Fe (Deng *et al.*, 2009).

O excesso de ferro na solução de cultivos das plantas de arroz causou efeitos severos na taxa de assimilação líquida de CO₂, função crucial para as plantas e altamente sensível a estresses. O cultivar Canastra apresentou queda fotossintética mais drástica em comparação com o cultivar BR-IRGA 409, expostos ao sulfato ferroso (Fig. 3). Danos estruturais celulares, como das moléculas da clorofila à ação das EROs (Spiller e Terry, 1980; Terry, 1980; Thompson *et al.*, 1987; Gallego *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1997; Vansuyt *et al.*, 1997; Becana *et al.*, 1998), induzidos por Fe, podem afetar os complexos protéicos da cadeia transportadora de elétrons fotossintética e conseqüentemente ocasionar perda da capacidade de fixação de carbono nos cloroplastos (Scandalios, 1993). Dentre os complexos fotossintéticos, a proteína psbA, presente no fotossistema II (FSII), é o componente da membrana do tilacóide mais rapidamente regenerado e, seu contínuo reparo, é crítico para a funcionalidade do FSII (Bhagwat e Bhattacharjee, 2005). O aumento na expressão do gene *OspsbA* no cultivar BR-IRGA 409 (Tab. 4), sugere um possível mecanismo protetor, atuando na remontagem do FSII a fim de reverter os possíveis danos oxidativos causados neste complexo. A redução nas taxas fotossintéticas, ainda, foi acompanhada pela diminuição da condutância estomática e da transpiração das plantas. No entanto, a exposição das plantas às dosagens tóxicas de ferro aumentou a relação C_i/C_a, em média, 17 % sob sulfato ferroso e 13 % em cultivo com cloreto férrico, para os cultivares avaliados (Fig 3, Tab. 3), o que indica um efeito negativo na etapa bioquímica da fotossíntese.

A diminuição da etapa fotoquímica foi verificada também através da redução drástica na taxa de transporte de elétrons (ETR) da etapa fotoquímica da fotossíntese, mais pronunciado nas plantas do cultivar Canastra, cultivados em excesso de sulfato ferroso. A diminuição no ETR foi acompanhado pela redução nos valores de q_L , coeficiente de extinção fotoquímico (Fig. 5, 7-8), o qual estima a fração de centros de reação abertos do FSII (Klughammer e Schreiber, 2008).

A fim de evitar danos fisiológicos pelo estresse imposto, as plantas de arroz, em resposta ao excesso de ferro, apresentaram aumento na dissipação do excesso de energia absorvido. Essa dissipação foi realizada pelos rendimentos quânticos regulado (Y_{NPQ}) e não regulado (Y_{NO}) de energia, em detrimento ao rendimento quântico de conversão fotoquímica de energia no FSII (Y_{II}), diretamente relacionado ao ETR. Isso ocorre uma vez que Y_{II} , Y_{NPQ} e Y_{NO} são competitivos entre si (Eskling *et al.*, 1997). A redução do Y_{II} foi acompanhada pelo aumento do Y_{NPQ} , uma vez que o Y_{NO} não foi alterado nos cultivares de arroz cultivados sob excesso de ferro (Fig. 6-8). A dissipação de energia via Y_{NPQ} está diretamente associada à dissipação de energia na forma de calor, pelo ciclo das xantofilas (Gilmoré *et al.*, 1995; Demmig-Adams e Adams, 1996; Niyogi *et al.*, 1997; Baroli e Niyogi, 2000). Esse mecanismo de dissipação não-fotoquímica tem sido efetivo em plantas expostas a estresses, como o excesso de Fe (Wilson *et al.*, 2007; Pereira, 2009). A zeaxantina, ainda, componente do ciclo das xantofilas tem sido indicada em participar do processo de reparo do FSII e pode ser crítica na proteção deste fotossistema, importante na degradação de proteínas não-funcionais e substituição da D1 (Jin *et al.*, 2003).

Como processos celulares alternativos na dissipação de elétrons, sob condições de estresse, têm sido descrito a fotorrespiração (Wingler *et al.*, 2000), o ciclo água-água (Asada, 2000) ou o fluxo cíclico de elétrons (Heber, 2002). O aumento na expressão do gene *OsGS* tem papel chave na fotorrespiração (Biesiadka e Legocki, 1997) e pode indicar um mecanismo de dissipação do excesso de energia nos cultivares Canastra e BR-IRGA 409, sob toxidez por Fe. Ambos os cultivares apresentaram incremento na expressão gênica de *GS*, sendo, no entanto, mais evidenciado no cultivar Canastra (Tab. 4). Uma expressão menos pronunciada de *OsGS1* no cultivar de cultivo irrigado pode ser devido outros mecanismos eficientes na dissipação de energia nessas plantas.

A tolerância das plantas, aos elevados níveis de Fe nos tecidos, envolve ainda, o armazenamento de Fe sob uma forma não tóxica, como a incorporação desse metal na molécula da ferritina (Briat e Lobréaux, 1997; Majerus *et al.*, 2009; Briat *et al.*, 2010a).

Esse mecanismo foi, possivelmente, utilizado em ambos os cultivares, observado através do aumento expressivo nos níveis de mRNA do gene da ferritina (*OsFER1*) (Tab. 4). A atuação sequestrante da ferritina desempenha, ainda, um importante papel na defesa das plantas contra o estresse oxidativo induzido por ferro, impedindo o metal de reagir com o oxigênio (Ravet *et al.*, 2009; Briat *et al.*, 2010b).

O excesso de ferro nos tecidos foliares, ao longo de dias, promoveu, além das alterações fisiológicas, colapso celular decorrente as injúrias das células da epiderme e do parênquima, e redução na espessura do mesofilo foram seguidas por necrose foliar (Figs. 11-12). Este sintoma, ocorrido de forma pronunciada nas plantas tratadas com sulfato ferroso, é um indicativo de estresse oxidativo ocorrido nas folhas (Bode *et al.*, 1995a; 1995b). As plantas do cultivar Canastra, cultivo de sequeiro apresentaram um padrão de APX, responsável pela detoxificação de H₂O₂ (Noctor e Foyer, 1998), independente do tratamento, superior ao padrão encontrado para as plantas do cultivar BR-IRGA 409 (Fig. 9). O estresse observado pode ser decorrente combinação do excesso de ferro no meio e o sistema hidropônico não aerado imposto. A atividade das enzimas antioxidantes avaliadas, no entanto, não diferiu entre os tratamentos impostos (Fig. 9) após sete dias de exposição ao estresse por ferro. O que pode indicar que, neste período, as plantas já não utilizavam mais o mecanismo antioxidante enzimático como defesa ao estresse por ferro.

5. CONCLUSÕES

A disponibilidade de sulfato ferroso na solução de cultivo promoveu toxidez mais acentuada nas plantas de arroz em relação ao cloreto férrico e citrato férrico.

O cultivar Canastra, recomendado para sistema de cultivo em terras altas, apresentou maior sensibilidade às fontes tóxicas de ferro.

A exposição de fontes tóxicas de ferro divalente e trivalente afetaram diferencialmente a absorção e translocação de nutrientes.

Dentre os parâmetros avaliados, as taxas fotossintética e de transporte de elétrons mostraram-se mais sensíveis para a detecção da toxidez por Fe.

A dissipação regulada de energia (Y_{NPQ}), assim como a expressão da ferritina, demonstraram ser mecanismos fortemente atuantes na manutenção do estresse por ferro, por sete dias de exposição.

Plantas de sequeiro, sob condição não aerada, apresentam maior sensibilidade ao excesso de Fe em solução. No entanto, permitiu uma maior translocação de Fe para as folhas possivelmente devido à carga genética imposta por sua condição natural, ausência de Fe biodisponível.

6. ANEXOS

Tabela A1. Genes analisados de *Oryza sativa* com os respectivos *primers* utilizados.

GENES	Acesso NCBI*	Primers Fw/Rv 5'-3'	Tm (° C) Fw/Rv
<i>OsACT1</i>	NC_008397.2	GGTTCATCAAGAAGGGACCCGG TGGAGGTGTATCCTGATGCGACAA	57/58
<i>OsFER1</i>	NC_008404.2	GCACGCAGTAGCAATGGAGTGA AGCGGCCCATGTTCCTTTT	58/58
<i>OsGLU</i>	NC_008397.2	ATCACATCGGCTACGGTCTT GGAGGCGACTGAGAAGGTC	53/54
<i>OsGSI</i>	NC_008395.2	TGACGCCACGACATCCTCGT CAATGGAGCAACCGGAGCGA	58/57
<i>OsNAAT1</i>	NC_008395.2	ATCGGCAACTACGCGTTGGG AGGTTTGAGTTCACCTGCCGG	58/57
<i>OsNAS1</i>	NC_008396.2	GCTGTGTCTCGCTGTCCGTG GGCACGGATCAATGCCCAGG	59/59
<i>OsPII</i>	NC_008394.4	TCCTCTCTACCCCAACAATGG TGGAGAAGGAAGACCTGCCAAA	55/56
<i>OspsbA</i>	NC_001320.1	CTGTGGGGTCGCTTCTGCAAC TACTGGAGGGGCAGCGATGAA	58/57
<i>OsPTF1</i>	NC_008399.2	CGGCTGCAGAAATGTGCTGGA TGTGCAACAGGCACACAATAGCT	58/58
<i>OsTUB</i>	NC_008397.2	TACCGTGCCCTTACTGTTCC CGGTGGAATGTACAGACAC	55/55
<i>OsUBQ5</i>	NC_008394.4	ACCACTTCGACCGCCACTACT ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	57/58
<i>OsYSL1</i>	NC_008397.2	GCTGAAAATAGCGCAAATCCGTTG AGTTACTGCACTTTTGCGCAGTC	57/57

* Acesso obtido pelo BLASTN das sequências *forward* e *reverse*.

Tabela A2. Teor (mg kg⁻¹) de 18 elementos nas raízes de dois cultivares de *Oryza sativa*, cultivados sob excesso de sulfato ferroso (FeSO₄-EDTA, 7 mM), cloreto férrico (FeCl₃-EDTA, 7 mM) e citrato férrico (7 mM), por sete dias, em sistema hidropônico.

		B	Na	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe
Canastra	Controle	46 ± 9,5	13751 ± 1076	850 ± 25	3533 ± 186	7064 ± 721	11808 ± 945	1018 ± 82	14,9 ± 0,8	108 ± 15
	FeSO ₄ -EDTA	58 ± 8,2	13511 ± 1361	714 ± 61	3533 ± 172	5162 ± 508	6512 ± 659	1074 ± 362	13,9 ± 1,1	992 ± 35
	FeCl ₃ -EDTA	54 ± 19	12012 ± 4120	745 ± 264	2977 ± 1082	4786 ± 1803	7245 ± 2559	1041 ± 800	14,2 ± 5,2	458 ± 163
	Citrato	37 ± 7,2	11388 ± 2825	696 ± 173	2947 ± 720	5385 ± 1389	7106 ± 1792	680 ± 155	11,2 ± 2,4	346 ± 75
BR-IRGA 409	Controle	37 ± 4,4	11204 ± 1274	867 ± 91	3294 ± 99	6510 ± 326	10927 ± 1354	771 ± 300	14,9 ± 1,2	119 ± 14
	FeSO ₄ -EDTA	71 ± 15	15623 ± 1914	748 ± 52	2800 ± 218	7498 ± 713	6250 ± 544	1937 ± 851	14,6 ± 0,8	1643 ± 154
	FeCl ₃ -EDTA	61 ± 7,8	15995 ± 1514	888 ± 49	2457 ± 58	7411 ± 281	7432 ± 310	739 ± 318	15,9 ± 0,7	503 ± 13
	Citrato	43 ± 9,6	14492 ± 4187	824 ± 64	3218 ± 274	7035 ± 1414	6943 ± 859	504 ± 100	14,1 ± 0,3	785 ± 154
		Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd
Canastra	Controle	0,40 ± 0,032	0,84 ± 0,021	23,3 ± 1,54	48,9 ± 4,80	77,06 ± 43,9	2,75 ± 0,29	3,841 ± 0,13	2,42 ± 0,10	0,66 ± 0,17
	FeSO ₄ -EDTA	0,52 ± 0,049	1,53 ± 0,635	36,8 ± 4,64	57,3 ± 5,92	46,61 ± 19,4	2,22 ± 0,06	5,123 ± 1,37	2,46 ± 0,19	1,01 ± 0,18
	FeCl ₃ -EDTA	0,77 ± 0,284	1,77 ± 0,440	112,2 ± 43	32,1 ± 10,6	33,88 ± 8,06	1,88 ± 0,71	4,380 ± 2,09	1,24 ± 0,42	0,75 ± 0,40
	Citrato	0,94 ± 0,253	1,33 ± 0,350	39,6 ± 3,96	35,8 ± 11,9	44,82 ± 30,1	1,89 ± 0,46	3,436 ± 0,94	2,05 ± 0,64	0,76 ± 0,34
BR-IRGA 409	Controle	0,31 ± 0,034	0,73 ± 0,164	70,4 ± 11,74	54,8 ± 4,53	71,17 ± 24,5	2,51 ± 0,20	4,996 ± 0,84	3,41 ± 0,38	1,27 ± 0,28
	FeSO ₄ -EDTA	0,32 ± 0,005	1,32 ± 0,213	63,5 ± 4,58	65,7 ± 6,46	59,34 ± 12,3	2,57 ± 0,10	6,680 ± 1,45	3,60 ± 0,40	0,68 ± 0,11
	FeCl ₃ -EDTA	0,99 ± 0,082	3,02 ± 0,350	311,6 ± 30	55,3 ± 1,87	54,18 ± 22,9	2,49 ± 0,19	3,693 ± 0,70	2,19 ± 0,15	0,34 ± 0,07
	Citrato	0,99 ± 0,097	1,64 ± 0,213	106,7 ± 14,3	45,0 ± 4,17	150,08 ± 77,6	2,38 ± 0,21	3,504 ± 0,10	3,36 ± 0,27	0,22 ± 0,06

Tabela A3. Teor (mg kg⁻¹) de 18 elementos nas folhas de dois cultivares de *Oryza sativa*, cultivados sob excesso de sulfato ferroso (FeSO₄-EDTA, 7 mM), cloreto férrico (FeCl₃-EDTA, 7 mM) e citrato férrico (7 mM), por sete dias, em sistema hidropônico.

		B	Na	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe
Canastra	Controle	58 ± 3,5	248 ± 24	6765 ± 229	15865 ± 672	3917 ± 174	39917 ± 1218	1280 ± 61	501 ± 21	88 ± 7,,5
	FeSO ₄ -EDTA	86 ± 6,8	1383 ± 174	5065 ± 127	9608 ± 225	4947 ± 201	40124 ± 1354	924 ± 68	271 ± 10	325 ± 21
	FeCl ₃ -EDTA	49 ± 16	1673 ± 656	4243 ± 1595	6388 ± 2384	2844 ± 1024	27832 ± 10292	841 ± 303	215 ± 79	283 ± 109
	Citrato	58 ± 16	966 ± 198	5073 ± 1341	7862 ± 2149	3626 ± 1002	28765 ± 7292	850 ± 215	249 ± 68	528 ± 168
BR-IRGA 409	Controle	62 ± 5,6	246 ± 65	7531 ± 424	16727 ± 1119	4207 ± 147	39887 ± 2674	1358 ± 83	352 ± 15	95 ± 6,3
	FeSO ₄ -EDTA	125 ± 6,2	1318 ± 280	5500 ± 234	8482 ± 428	5622 ± 242	38059 ± 905	990 ± 73	145 ± 11	325 ± 51
	FeCl ₃ -EDTA	79 ± 4,5	1222 ± 108	6675 ± 319	7633 ± 382	4277 ± 188	34292 ± 1404	1191 ± 142	192 ± 16	279 ± 8,8
	Citrato	85 ± 10	1188 ± 154	5904 ± 382	8182 ± 325	3850 ± 123	36891 ± 2395	862 ± 74	152 ± 10	421 ± 171
		Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd
Canastra	Controle	0,10 ± 0,004	0,84 ± 0,110	11,4 ± 0,72	28,4 ± 0,81	0,057 ± 0,019	4,00 ± 0,11	0,418 ± 0,03	2,58 ± 0,16	0,205 ± 0,02
	FeSO ₄ -EDTA	0,10 ± 0,011	0,69 ± 0,062	11,5 ± 0,38	39,0 ± 3,33	0,070 ± 0,015	3,21 ± 0,13	0,548 ± 0,14	1,52 ± 0,06	0,341 ± 0,08
	FeCl ₃ -EDTA	0,10 ± 0,039	0,93 ± 0,345	14,4 ± 5,55	24,8 ± 8,37	0,028 ± 0,012	2,45 ± 0,90	0,345 ± 0,09	1,07 ± 0,40	0,116 ± 0,04
	Citrato	0,17 ± 0,052	1,33 ± 0,427	11,9 ± 2,47	24,5 ± 6,40	0,050 ± 0,018	2,71 ± 0,71	0,343 ± 0,10	1,65 ± 0,48	0,083 ± 0,02
BR-IRGA 409	Controle	0,06 ± 0,005	0,73 ± 0,132	19,4 ± 0,39	30,0 ± 1,96	0,186 ± 0,106	4,01 ± 0,30	0,527 ± 0,10	2,11 ± 0,08	0,108 ± 0,02
	FeSO ₄ -EDTA	0,08 ± 0,005	0,58 ± 0,086	18,4 ± 0,88	32,5 ± 1,35	0,086 ± 0,026	2,92 ± 0,10	0,542 ± 0,05	1,73 ± 0,27	0,130 ± 0,03
	FeCl ₃ -EDTA	0,10 ± 0,007	1,04 ± 0,245	32,4 ± 0,86	30,4 ± 0,78	0,050 ± 0,014	3,14 ± 0,09	0,537 ± 0,02	1,53 ± 0,12	0,103 ± 0,03
	Citrato	0,14 ± 0,006	1,15 ± 0,096	16,0 ± 0,36	27,1 ± 1,75	0,080 ± 0,019	3,14 ± 0,20	0,493 ± 0,03	1,46 ± 0,12	0,112 ± 0,01

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abichequer, A.D.; Bohnen, H (1998) Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 22: 21-26
- Anderson, M.E. (1985) Determination of glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology** 113: 584-555
- Asada, K. (2000) The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biological Science** 355: 1419-1431
- Audebert, A.; Fofana, M. (2009) Rice Yield Gap due to Iron Toxicity in West Africa. **Journal of Agronomy & Crop Science** 195: 66-76
- Azambuja, I.H.V.; Venetti Jr., F.J.; Magalhães Jr., A.M. (2004) **Aspectos socioeconômicos da produção de arroz**. In: Gomes, A.S.; Magalhães Jr. (eds.) Arroz Irrigado no Sul do Brasil: Empraba Informação Tecnológica. p. 23-44
- Baroli, I.; Niyogi, K.K. (2000) Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B** 355: 1385-1394
- Batty, L.C.; Baker, A.J.M.; Wheeler, B.D.; Curtis, C.D. (2000) The effect of pH and plaque of Cu and Mn in *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel. **Annals of Botany** 86: 647-653
- Becana, M.; Moran, J.-F.; Iturbe-Ormaetxe, I. (1998) Iron-dependant oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stresses: toxicity and antioxydant protection. **Plant Soil** 201: 137-147
- Bhagwat, A.S.; Bhattacharjee, S.K. (2005) **Thermoluminescence as a Tool in the Study of Photosynthesis**. Cap 2. In: Pessaraki, M. (ed.) Handbook of Photosynthesis. 2 ed. 862 p
- Biesiadka, J.; Legocki, A.B. (1997) Evolution of the glutamine synthetase gene in plants. **Plant Science** 128: 51-58
- Bilger, W.; Schreiber, U.; Bock, M. (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia** 102: 425-432
- Bode, K.; Döring, O.; Lüthje, S.; Böttger, M. (1995a) Induction of iron toxicity symptoms in rice (*Oryza sativa* L.). **Mitteilungen aus dem Institut für allgemeine Botanik in Hamburg** 25:35-43
- Bode, K.; Döring, O.; Lüthje, S.; Neue, H.-U.; Böttger, M. (1995b) The role of active oxygen in iron tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). **Protoplasma** 184: 249-255
- Briat JF, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobreaux S, Pascall N, Savino G, Thoiron S, Von Wiren N, Wuytswinkel O (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. **Biology of the Cell** 84:69-81
- Briat, J.-F.; Curie, C.; Gaumard, F. (2007) Iron utilization and metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 10: 276-282

- Briat, J.-F.; Duc, C.; Ravet, K., Gaymard, F. (2010a) Ferritins and iron storage in plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1800: 806-814
- Briat, J.-F.; Lobreáaux, S. (1997) Iron Transport and storage in plants. **Trends in Plant** 2: 187-193
- Briat, J.-F.; Ravet, K.; Arnaud, N.; Duc, C.; Boucherez, J; Touraine, B.; Cellier, F.; Gaymard, F. (2010b) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. **Annals of Botany** 105: 811-822
- Bruggemann, W.; Maass-Kantel, K.; Moog, P. R. (1993) Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane bound ferric-chelate reductase. **Planta** 190:151-155
- Bughio, N.; Yamaguchi, H.; Nishizawa, N.K.; Nakanishi, H.; Mori, S. (2002) Cloning an iron regulated metal transporter from rice. **Journal of Experimental Botany** 53: 1677-1682
- Carlberg, I.; Mannervik, B. (1985) Glutathione reductase. **Methods Enzymol.** 113:484-490
- Cataldo, D.A.; Mcfadden, K.M.; Garland, T.R.; Willdung, R.E. (1988) Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II), and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. **Plant Physiology** 86:734-739
- Chen, R.F.; Shen, R.F.; Gu, P.; Dong, X.Y.; Du, C.W.; Ma, J.F. (2006) Response of Rice (*Oryza sativa*) with Root Surface Iron Plaque Under Aluminium Stress. **Annals of Botany** 98: 389-395
- Cordeiro, A.C.C.; Medeiros, R.D. (2008) **Cultivares de Arroz Irrigado Recomendadas para Roraima**. Circular Técnica 03: Embrapa Roraima p. 1-12
- Counce, P.; Keisling, T.C.; Mitchell, A.J. (2000) A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science** 40: 436-443
- Curie, C.; Briat, J.F. (2003) Iron transport and signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology** 54: 183-206
- Curie, C.; Panaviene, Z.; Loulergue, C.; Dellaporta, S.L.; Briat, J.-F.; Walker, E.L. (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. **Nature** 409: 346-349
- Demmig-Adams, B.; Adams, W.W (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. **Trends in Plant Science** 1: 21-26
- Deng, H.; Ye, Z.H.; Wong, M.H. (2009) Lead, zinc and iron (Fe²⁺) tolerances in wetland plants and relation to root anatomy and spatial pattern of ROL. **Environmental and Experimental Botany** 65: 353-362
- Dobermann, A.; Fairhurst, T. (2000) Toxicidad de hierro en arroz. *In*: Dobermann, A.; Fairhurst, T. (Eds.). **Rice: nutrient disorders & nutrient management**. Potash and Phosphate Institute and International Rice Research Institute. p. 1-4
- Doran, G.; Eberbach, P.; Helliwell, S. (2006) The impact of rice plant roots on the reducing conditions in flooded rice soils. **Chemosphere** 63: 1892-1902
- Edge, R.; McGarvey, D.J.; Truscott, T.G. (1997) The carotenoids as anti-oxidants – a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology** 41: 189-200

- Ehleringer, J. (1981) Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. **Oecologia** 102: 366-370
- Eide, D.; Broderius, M.; Fett, J.P.; Guerinot, M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **Proceeding of the National Academy Science** 93: 5624-5628
- Engel, K. (2009) **Efficiency of adaptation mechanisms of rice to diverse conditions of iron toxicity.** *In: The Proceedings of the International Plant Nutrition. Colloquim XV!*, University Of California, Davis. p 1372-1376
- Eskling, M.; Arvidsson, P.-O.; Akerlund, H.-E. (1997) The xanthophyll cycle, its regulation and components. **Physiologia Plantarum** 100: 806-816
- Fageria, N.K.; Santos, A.B.; Barbosa Filho, M.P.; Guimarães, C.M. (2008) Iron toxicity in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition** 31: 1676-1697
- Fang, W.; Wang, J.; Lin, C.; Kao, C. (2001) Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation** 35: 75-80
- Fox, T.C.; Guerinot, M.L (1998) Molecular biology of cation transport in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 49: 669-696
- Foyer, C.H.;Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta** 133:21-25
- Gallego, S.M.; Benavides, M.P.; Tomaro, M.L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science** 121:151-159
- Genon, J.; Hepcée, N.; Duffey, J.; Delvaux, B.; Hennebert, P. (1994) Iron toxicity and other chemical soil constraints to rice in highland swamps of Burundi. **Plant and Soil** 166: 109-115
- Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta** 990: 87-92
- Giaquinta R T (1980) Translocation of sucrose and oligosaccharides. *In: Preiss, J. (ed.), The Biochemistry of Plants* Vol. 3. Academic Press, New York.
- Gilmoré, A.M.; Hazlett, T.L.; Govindjee (1995) Xanthophyll cycle-dependent quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence: Formation of a quenching complex with a short fluorescence lifetime. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 92: 2273-2277
- Greenland, D.J.; De Datta, S.K. (1985) **Constraint to rice production and wetland soils characteristics.** International Rice Research Institute. Wetland soils: Characterization, classification e utilization. 559 p
- Gross, J.; Stein, R.J.; Fett-Neto, A.G.; Fett, J.P. (2003) Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology** 26: 477-497
- Grotz, N.; Guerinot, M.L. (2006) Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1763 :595-608
- Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta** 1465: 190-198

- Havir, E.A.; McHale, N.A. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology** 84: 450-455
- Heber, U. (2002) Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. **Photosynthesis Research** 73: 223-231
- Hell, R.; Stephan, U.W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta** 216: 541-551
- Hendrikson, L.; Furbank, R.; Chow, W.S. (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. **Photosynthesis Research** 82: 73-81
- Hirsch, J.; Marin, E.; Floriani, M.; Chiarenza, S.; Richaud, P.; Nussaume, L.; Thibaud, M.C. (2006) Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in Arabidopsis plants. **Biochimie** 88: 1767-1771
- Hose, E.; Clarkson, D.T.; Steudle, E.; Schreiber, L.; Hartung, W. (2001) The exodermis: a variable apoplastic barrier. **Journal of Experimental Botany** 52:2245-2264
- Howeler, R.H. (1973) Iron- induced orange disease of rice in relation to physicochemical changes in flooded soil. **Soil Science Society of American Proceedings** 37: 898-903
- Inoue, H.; Kobayashi, T.; Nozoye, T.; Takahashi, M.; Kakei, Y.; Suzuki, K.; Nakazono, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2009) Rice *OsYSL15* Is an Iron-regulated Iron(III)-Deoxymugineic Acid Transporter Expressed in the Roots and Is Essential for Iron Uptake in Early Growth of the Seedlings. **The Journal of Biological Chemistry** 284: 3470-3479
- Ishimaru, Y.; Suzuki, M.; Tsukamoto, T.; Suzuki, K.; Nakazono, M.; Kobayashi, T.; Wada, Y.; Watanabe, S.; Matsushashi, S.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2006) Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. **The Plant Journal** 45: 335-346
- Jaleel, C.A. (2009) Non-Enzymatic Antioxidant Changes in *Withania somnifera* with Varying Drought Stress Levels. **American-Eurasian Journal of Scientific Research** 4 (2): 64-67
- Jeong, J.; Connolly, E.L. (2009) Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. **Plant Science** 176: 709-714
- Jin, E.; Yokthongwattana, K.; Polle, J.E.W.; Melis, A. (2003) Role of reversible xanthophyll cycle in the PSII damage and repair cycle in *Dunaliella salina*. **Plant Physiology** 132:352-364
- Karnovsky, M. J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology** 27: 136-137
- Khamis S, Chaillou S, Lamaze T (1990) CO₂ assimilation and partitioning in maize plants deprived of orthophosphate. **Journal of Experimental Botany** 41:1619-1625
- Kim, S.A.; Guerinot, M.L. (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. **FEBS Letters** 581: 2273-2280
- Klughammer, C.; Schreiber, U. (2008) Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. **PAM Application notes** 1: 27-35

- Koike, S.; Ionue, H.; Mizuno, D.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2004) *OsYSL2* is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. **The Plant Journal** 39: 415-424
- Koshiha, T. (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedling and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant, Cell and Physiology** 34: 713-721
- Kramer, D.M.; Johnson, G.; Kiirats, O.; Edwards, G.E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. **Photosynthesis Research** 79: 209-218
- Krinsky, N.I.; Yeum, K.-J. (2003) Carotenoid–radical interactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 305: 754-760
- Lahner, B.; Gong, T.; Mahmoudian, M.; Smith, E.L.; Abid, K.B.; Rogers, E.E.; Guerinot, M.L.; Harper, I.F.; Ward, J.M.; Meintyre, L.; Schroeder, J.I.; Salt, D.E. (2003) Genomic scale profiling of nutrients and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology** 21:1215-1225
- Laisk, A.; Loreto, F. (1996) Determining photosynthetic parameters from leaf CO_2 exchange and chlorophyll fluorescence. **Plant Physiology** 110: 903-912
- Liu, Y.; Tam, N.F.Y.; Yang, J.X.; Pi, N.; Wong, M.H.; Ye, Z.H. (2009) Mixed heavy metals tolerance and radial oxygen loss in mangrove seedlings. **Marine Pollution Bulletin** 58:1843-1849
- Liu, H.; Zhang, J.; Christiec, P.; Zhang, F. (2008) Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. **Science of the Total Environment** 394: 361-368
- Lupínková, L.; Komenda, J. (2004) Oxidative modifications of the photosystem II D1 protein by reactive oxygen species: from isolated protein to cyanobacterial cells. **Photochemistry and Photobiology** 79: 152-162
- Ma, J.F.; Shinada, T.; Matsuda, C.; Nomoto, K. (1995) Biosynthesis of phytosiderophores, mugineic acids, associated with methionine cycling. **The Journal of Biological Chemistry** 270:16549-16554
- Majerus, V.; Bertin, P.; Lutts, S. (2009) Abscisic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. **Plant Soil** 324: 253-265
- Marschner, H. (1995) **Functions of mineral nutrients: macronutrients**. In: Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press. p 229-312
- Mino, Y.; Ishida, T.; Ota, N.; Inoue, M.; Nomoto, K.; Takemoto, T.; Tanaka, H.; Sugiura, Y. (1983) Mugineic acid-iron (III) complex and its structurally analogous cobalt(III) complex: characterization and implication for absorption and transport of iron in gramineous plants. **Journal of the American Chemical Society** 105: 4671-4676
- Mishra, S.; Dubey, R.S. (2005) **Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants**. Cap 45. In: Pessaraki, M. (ed.) Handbook of Photosynthesis. 2 ed. 862 p
- Mori, S. (1999) Iron acquisition by plants. **Current Opinion in Plant Biology** 2: 250-253

- Murgia, I.; Delledonne, M.; Soave, C. (2002). Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. **The Plant Journal** 30: 521-528
- Nakano, Y.; Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant, Cell and Physiology** 22: 867-880.
- Nenova, V.R. (2009) Growth and photosynthesis of pea plants under different iron supply. **Acta Physiologiae Plantarum** 31: 385-391
- Niyogi, K.K.; Björkman, O.; Grossman, A.R. (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 94: 14162-14167
- Noctor, G.; Foyer, C.H. (1998) Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 49:249-79
- Olaleye, A.O.; Ogunkunle, A.O.; Singh, B.N.; Odeleye, F.O. Dada, O.A.; Senjobi, B.A. (2009) Elemental Composition of Two Rice Cultivars under Potentially Toxic on Aquept and Aquent. **Notulae Scientia Biologicae** 1: 46-49
- Olaleye, A.O.; Tabi, F.O.; Ogunkunle, A.O.; Singh, B.N.; Sahrawat, K.L. (2001) Effect of toxic iron concentrations on the growth of lowlands rice. **Journal of Plant Nutrition** 24: 441 - 457
- Ottow, J.C.G.; Benckiser, G.; Watanabe, I.; Santiago, S. (1983) Multiple nutritional soil stress as the prerequisite for iron toxicity of wetland rice (*Oryza sativa* L.). **Tropical Agriculture** 60: 102-106
- Oxborough, K. (2004) Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. **Journal of Experimental Botany** 55(400): 1195-1205
- Oxborough, K.; Baker, N.R. (1997) An instrument capable of imaging chlorophyll *a* fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at the cellular and sub-cellular levels of organization. **Plant, Cell and Environment** 20: 1473-1483
- Peixoto, P.H.P.; Cambraia, J.; Santanna, R.; Mosquim, P.R.; Moreira, M.A. (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 11: 137-143
- Pereira, E.G. (2009) **Efeitos tóxicos do ferro: alterações fisiológicas e morfológicas em plantas cultivadas e de restinga**. Tese de Doutorado: Universidade Federal de Viçosa. 117 p
- Pereira, E.G.; Oliva, M.A.; Kuki, K.N.; Cambraia, J. (2008) Photosynthetic changes and oxidative stress caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. **Trees** 23: 277-285
- Plesnicar, M.; Kastori, R.; Petrovic, N.; Pankovic, D. (1994) Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves as affected by phosphorus nutrition. **Journal of Experimental Botany** 45:919-924
- Polyakov, N.E.; Kruppa, A.I.; Leshina, T.V.; Konovalova, T.A.; Kispert, L.D. (2001) Carotenoids as Antioxidants: Spin Trapping EPR and Optical Study. **Free Radical Biology & Medicine** 31: 43-52

- Ponnamperuma, F.N. (1972) The chemical of submerged soils. **Advances in Agronomy** 24: 29-96
- Ravet, K.; Touraine, B.; Boucherez, J.; Briat, J.-F.; Gaymard, F.; Cellier, F. (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. **The Plant Journal** 57: 400-412
- Robinson, N.J.; Proctor, C.M.; Connolly, E.L.; Guerinot, M.L. (1999) A ferric chelate reductase for iron uptake from soils. **Nature** 397: 694-697
- Sahrawat, K.L. (2005) **Managing iron toxicity in lowland rice: the role of tolerant genotypes and plant nutrients**. In: Toriyama, K.; Heong, K.L.; Hardy, B. (Eds.). Rice is life: scientific perspectives for the 21st century: Proceedings of the World Rice Research Conference. Tsukuba, Japan. pp. 452-454
- Scandalios, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology** 101: 7-12
- Schmidt, W. (2003) Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. **Trends in Plant Science** 8: 188-193
- Shojima, S.; Nishizawa, N.K.; Tushiya, S.; Nozoe, S.; Trifune, T.; Mori, S. (1990) Biosynthesis of phytosiderophores In vitro by biosynthesis of 2'-deoxymugineic acid from l-methionine and nicotianamine **Plant Physiology** 93:1497-1503
- Silveira, V.C.; Oliveira, A.P.; Sperotto, R.A.; Amaral, L.; Dias, J.F.; Cunha, J.B.; Fett, J.P. (2007) Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 19: 127-139
- Sinha, A.; Saxena, R. (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere** 62:1340-1350
- Sinha, S.; Gupta, M.; Chandra, P. (1997) Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: responde of antioxidants. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 38: 286-291
- Smirnoff, N. (2005) **Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions**. In: Smirnoff, N. (Ed.) Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd. p. 53-86
- Snowden, R.; Wheeler, B.D. (1995) Chemical changes in selected wetland plant species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. **New Phytologist** 131: 503-520
- Soares, A.A.; Cornélio, V.M.O.; Soares, P.C.; Reis, M.S. (1997) Canastra e Confiança: Cultivares melhorados de arroz para plantio em condições de sequeiro tradicional e irrigado por aspersão. **Revista Ceres** 44: 230-240
- Sousa, R.O.; Gomes, A.S.; Vahl, L.C. (2004) **Toxidez por ferro em arroz irrigado**. In: Gomes, A.S.; Magalhães Jr. (eds.) Arroz Irrigado no Sul do Brasil: Empraba Informação Tecnológica. p. 305-337
- Souza-Santos, P.; Ramos, R.S.; Ferreira, S.T.; Carvalho-Alves, P.C. (2001) Iron induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta** 1512: 357-366

- Spiller, S.; Terry, N. (1980) Limiting Factors in Photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. **Plant Physiology** 65: 121-125
- Suh, H.-J.; Kim, C.S.; Lee, J.-Y.; Jung, J. (2002) Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. **Photochemistry and Photobiology** 75(5): 513-518
- Tanaka, A.; Loe, R.; Navasero, S.A. (1966) Some mechanisms involved in the development of iron toxicity symptoms in the Rice plant. **Soil Science and Plant Nutrition** 12: 32-38
- Taylor, G. J.; Crowder, A. A.; Rodden, R. (1984) Formation and morphology of an iron plaque on the roots of *Typha latifolia* L. grown in solution culture. **American Journal of Botany** 71(5): 666-675
- Taylor, G.J.; Crowder, A.A. (1983) Use of the DCB technique for extraction of hydrous iron oxides from roots of wetland plants. **American Journal of Botany** 70: 1254-1257
- Terry, N. (1980) Limiting Factors in Photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. **Plant Physiology** 65: 114-120
- Thipyapong, P.; Melkonian, J.; Wolfe, D.W.; Steffens, J.C. (2004): Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. **Plant Science** 167: 693-704
- Thompson, J.E.; Ledge, R.L.; Barber, R.F. (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. **New Phytologist** 105: 317-344
- Vansuyt, G.; Lopez, F.; Inzé, D.; Briat, J.F.; Fourcroy, P. (1997) Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. **FEBS Letter** 410: 1195-1200
- Varotto, C.; Maiwald, D.; Pesaresi, P.; Jahns, P.; Salamini, F.; Leister, D. (2002) The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal** 31: 589-599
- Wilson, A.; Boulay, C.; Wilde, A.; Kerfeld, C.A.; Kirilovsky, D. (2007) Light-Induced Energy Dissipation in Iron-Starved Cyanobacteria: Roles of OCP and IsiA Proteins. **The Plant Cell** 19: 656-672
- Wingler, A.; Lea, P.J.; Quick, W.P.; Leegood, R.C. (2000) Photorespiration: Metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Science** 355:1517-1529
- Yamauchi, M.; Peng, X.X. (1995) Iron toxicity and stress induced ethylene production in rice leaves. **Plant and Soil** 173: 21-28
- Zhao, S.; Fernald, R.D. (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology** 12(8): 1045-62
- Zheng, L.; Huang, F.; Narsai, R.; Wu, J.; Giraud, E.; He, F.; Cheng, L.; Wang, F.; Wu, P.; Whelan, J.; Shou, H. (2009) Physiological and transcriptome analysis of iron and phosphorus interaction in rice seedlings. **Plant Physiology** 151: 262-274

CAPÍTULO 2

FOTOSSÍNTESE E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* COMO FERRAMENTAS DE SELEÇÃO DE CULTIVARES DE ARROZ RESISTENTES AO FERRO

1. INTRODUÇÃO

O excesso de ferro (Fe) nas plantas induz alterações nos mecanismos envolvidos no processo fotossintético (Becana *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2001; Souza-Santos *et al.*, 2001; Briat *et al.*, 2007), sendo um dos mais importantes estresses abióticos que limitam a produção de arroz em cultivo irrigado (Dobermann e Fairhurst, 2000; Sahrawat, 2005; Fageria *et al.*, 2008; Olaleye *et al.*, 2001, 2009; Audebert e Fofana, 2009).

Sob condições aeróbicas, o ferro é comumente encontrado nos solos em sua forma trivalente (Fe^{3+}). Porém, em solos irrigados caracterizados por condições anaeróbicas e baixo pH (Ponnamperuma, 1972; Guerinot e Yi, 1994; Sousa *et al.*, 2004), grande parte deste elemento pode ser reduzido a Fe^{2+} . Nessa forma, ocorre aumento da disponibilidade de ferro para as plantas, onde, além da toxidez pela absorção excessiva (Fang *et al.*, 2001; Sahrawat, 2005), pode promover desordens nutricionais (Ottow *et al.*, 1983, Genon *et al.*, 1994; Snowden e Wheeler, 1995; Olaleye *et al.*, 2001, 2009; Silveira *et al.*, 2007; Audebert e Fofana, 2009) comprometendo o equilíbrio fisiológico das plantas. A toxidez pelo ferro é caracterizada visualmente por manchas necróticas nas folhas e escurecimento das raízes, promovendo inibição do crescimento da planta (Dobermann e Fairhurst, 2000). Dentre os nutrientes essenciais, a diminuição na absorção de P, K, Ca e Mg tem sido relatada para cultivares de arroz sensíveis ao excesso de Fe (Silveira *et al.*, 2007).

Uma vez na parte aérea, o ferro tem sido responsabilizado por induzir alterações nos mecanismos fisiológicos (Briat *et al.*, 2007). Dentre essas alterações, o Fe pode potencializar o estresse oxidativo (Becana *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2001; Souza-Santos *et al.*, 2001) ocasionando desestruturação de complexos protéicos fotossintetizantes (Spiller e Terry, 1980; Suh *et al.*, 2002; Lupínková e Komenda, 2004) e redução na assimilação líquida de carbono (Terry, 1980; Backhausen *et al.*, 2000; Mishra e Dubey, 2005; Dhir *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Pereira, 2009). Nessas condições, ocorre acúmulo de excesso de energia, o qual pode ser dissipado por processos celulares alternativos, como a fotorrespiração (Wingler *et al.*, 2000; Ort e Baker, 2002), o ciclo água-água (Asada, 2000; Cruz *et al.*, 2004) ou o fluxo cíclico de elétrons (Heber, 2002; Joliot e Joliot, 2006). O transporte cíclico de elétrons promove o aumento do gradiente de prótons no tilacóide, o qual favorece a dissipação não fotoquímica (NPQ) e a oxidação parcial do P_{700} (Golding e Johnson, 2003). O NPQ permite a dissipação

térmica de energia, importante para prevenir a superexcitação do fotossistema II (Maxwell e Johnson, 2000; Heber *et al.*, 2001).

Para sustentar o crescimento e evitar a toxicidade do ferro celular, as plantas dependem da capacidade de armazenar e remobilizar o ferro (Briat *et al.*, 2007). A resistência ao excesso de Fe em plantas de arroz pode ser uma consequência de exclusão de Fe e/ou tolerância a altas concentrações de Fe interno. Dentre os mecanismos envolvidos na tolerância a esse metal, destaca-se o seqüestro do elemento na forma de ferritina (Briat e Lobréaux, 1997; Gross *et al.*, 2003; Majerus *et al.*, 2007, 2009). No entanto, diferentes cultivares variam amplamente em sua capacidade de enfrentar o excesso de Fe. Com isso, tem sido sugerido que a manutenção dos níveis de nutrientes essenciais, das taxas fotossintéticas e principalmente o controle da expressão gênica em condições de excesso de Fe, contribuiriam para caracterizar fenótipos tolerantes.

O Fe^{+2} , em concentrações tóxicas, é capaz de produzir alterações na absorção de nutrientes, trocas gasosas e respostas enzimáticas controladas possivelmente por um sistema de sinais que induzem expressões gênicas específicas. Atualmente os estudos mais avançados de resistência de linhagens de arroz à toxidez por Fe estão sendo realizados através da identificação de genes associados à toxidez, que podem ser utilizados como marcadores moleculares. Todavia, o desconhecimento dos mecanismos fisiológicos que desencadeiam a toxidez tem sido um obstáculo para a utilização dessa técnica (Sousa *et al.*, 2004). Desta forma, o presente trabalho propõe verificar, através de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares, uma possível resistência à níveis tóxicos de ferro, em cultivares de arroz de diferentes procedências.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Condições de cultivo e Aplicação do tratamento

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), cultivares Canastra, BRSMG Curinga, BR-IRGA 409 e IRGA 419, foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio comercial (10%) por 10 min e germinadas em câmara de crescimento ($27 \pm 2^\circ$ C) por 7 dias no escuro e 7 dias com fotoperíodo de 12 h. As plântulas foram transferidas para solução nutritiva de Hoagland (pH 4,0, força total) em casa-de-vegetação. O pH foi ajustado a cada dois dias com KOH e/ou HCl e a solução renovada semanalmente.

Após aproximadamente 30 dias, as plantas no estágio V5 de desenvolvimento fenológico (Counce *et al.*, 2000), foram submetidas aos tratamentos com sulfato ferroso (FeSO_4) na concentração de cultivo (0,019 mM) e sob excesso de sulfato ferroso (FeSO_4 , 7 mM, Pereira (2009)) com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (p/p). Cada tratamento foi constituído por quatro repetições, sendo o pH ajustado diariamente a 4,0 e a solução renovada a cada 4 dias. As avaliações foram realizadas após sete dias de exposição ao excesso de ferro.

2.2. Variáveis Analisadas

2.2.1. Absorção do ferro e composição mineral do material vegetal

Para a quantificação do teor de nutrientes nas folhas e raízes, o material vegetal foi seco e moído em moinho tipo Wiley. Para minimizar qualquer interferência na quantificação de nutrientes na matéria seca das raízes, estas foram previamente lavadas em solução contendo ditonito de sódio, citrato de sódio e bicarbonato de sódio (Taylor e Crowder, 1983).

O material vegetal moído foi digerido em HNO_3 concentrado, à 118° C por 4 horas, e, em seguida diluído em água. A análise da composição mineral foi realizada utilizando a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) de acordo com Lahner *et al.* (2003). O teor dos minerais (mg kg^{-1}) determinados foram: magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca), boro (B), cobalto (Co), manganês (Mn), molibdênio (Mo), ferro (Fe), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênio (As), cádmio (Cd), estrôncio (Sr) e rubídio (Rb).

A partir dos teores de ferro obtidos, calculou-se o acúmulo de Fe nas raízes (AR) (Liu *et al.*, 2008) e na parte aérea (AP) (Abichequer e Bohem, 1998) pela razão entre o

conteúdo de ferro na parte aérea (CPA) ou nas raízes (CSR) pelo teor de ferro na planta inteira, como sendo:

$$AR (\%) = [CSR / (CPA + CSR)] * 100$$

$$AP (\%) = [CPA / (CPA+CSR)] * 100$$

2.2.2. Determinação das trocas gasosas

As medições de trocas gasosas foram realizadas em folhas completamente expandidas. As variáveis, taxa de assimilação fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E) e a razão entre concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) foram determinadas por um analisador de gás por infravermelho (IRGA; modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre 8:00 e 11:30 a.m., utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 (C_a) ($\sim 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$), temperatura ($24 - 28 \text{ }^\circ\text{C}$) e umidade ambiente ($50 - 68 \%$).

Respostas de A em fun\u00e7\u00e3o de C_i (curva A/C_i) foram obtidas pela inje\u00e7\u00e3o de diferentes concentra\u00e7\u00f5es de CO_2 na c\u00e2mara, controladas automaticamente por um dispositivo injetor do LI-6400xt (6400-01 CO_2 injector; LI-COR, USA) utilizando-se cartuchos de 12 g de CO_2 sob alta press\u00e3o. As medi\u00e7\u00f5es da curva A/C_i foram realizadas em nove n\u00edveis de CO_2 (50, 100, 200, 400, 700, 1000, 1300, 1600 e $2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$), sob n\u00edvel de irradi\u00e2ncia de $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em intervalo de 2 a 3 minutos entre as leituras, nas mesmas condi\u00e7\u00f5es ambientais descritas acima.

2.2.3. Avalia\u00e7\u00e3o carboxilativa e regenera\u00e7\u00e3o da RuBP

A taxa m\u00e1xima de carboxila\u00e7\u00e3o ($V_{c,max}$) da enzima carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5 bisfostato (Rubisco), a taxa de transporte de el\u00e9trons dirigindo a regenera\u00e7\u00e3o da ribulose-1,5 bisfostato (RuBP) (J_{max}) e a utiliza\u00e7\u00e3o da triose f\u00f3sforo (V_{TPU}) foram calculadas segundo Long e Bernacchi (2003) e Sharkey et. al. (2007). Para os c\u00e1lculos foram utilizados os par\u00e2metros de trocas gasosas, temperatura foliar, press\u00e3o atmosf\u00e9rica e curva A/C_i corrigida:

$$A_{\text{corrigido}} = A - [(0.00171 \times CO_2S) - 1.2519]$$

$$C_{i,\text{corrigido}} = [(gCO_2 - (E/2000)) \times CO_2S - A_{\text{corrigido}}] / [gCO_2 + (E/2000)]$$

$$gCO_2 = 1 / [(1.6/g_s) + ((1.37 \times 1) / BL\text{Cond})]$$

onde, BLcond representa a condut\u00e2ncia da camada lim\u00edtrofe, obtido pelo IRGA.

A partir desses dados, o $V_{c,max}$, J_{max} e V_{TPU} foram estimados pelas seguintes equações:

$$(1) A = V_{c,Max} \frac{C_c - \Gamma^*}{C_c + K_c (1 + O/K_o)} - R_d$$

Onde, C_c é a pressão parcial de CO_2 da Rubisco, K_c é a constante de Michaelis da Rubisco para o dióxido de carbono, O é a pressão parcial de O_2 na Rubisco e K_o é a constante de inibição da Rubisco para o oxigênio. Desta forma, $V_{c,max}$ representa a inclinação da curva A/C_i e $-R_d$ o intercepto (Long e Bernacchi, 2003).

Quando A é limitada pela regeneração da RuBP,

$$(2) A = J \frac{C_c - \Gamma^*}{4C_c + 8\Gamma^*} - R_d$$

onde J é a taxa de transporte de elétrons. Esta equação assume quatro elétrons por carboxilação e oxigenação.

Quando A é limitada pela TPU ,

$$(3) A = 3 TPU - R_d$$

onde TPU é a taxa de uso das triose fosfatos.

2.2.4. Determinação da fotorrespiração *in vivo*

A fotorrespiração foi obtida a partir dos dados de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a , de acordo com Epron *et al.* (1995) e Valentini *et al.* (1995). Para os cálculos assumiu-se que o fluxo de elétrons linear é levado a carboxilação e oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato (ou seja, todos os outros processos consumindo os elétrons de luz dirigido são desprezíveis), quatro elétrons são necessários para cada ciclo de carboxilação ou oxigenação e uma molécula de CO_2 é lançada a cada dois ciclos de oxigenação por descarboxilação da glicina na fotorrespiração. Assim:

$$J_t = (F_m' - F_s) / F_m' \cdot PAR \cdot 0,454$$

$$J_c = 1/3 [J_t + 8 (A + R_d)]$$

$$J_o = 2/3 [J_t - 4 (A + R_d)]$$

$$Rl = [J_t - 4 (A + R_d)] / 12$$

onde J_t é a taxa total de transporte de elétrons através do FSII da fotossíntese e fotorrespiração; $(F_m' - F_s) / F_m'$ é o rendimento quântico efetivo do fluxo linear de elétrons pelo FSII; PAR é o fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; 0,454 representa a proporção de quanta utilizados pelos centros de reação do FSII (Melis *et al.*, 1987), respectivamente; J_c e J_o são os elétrons atribuídos às reações de carboxilação

e oxigenase da RuBP, respectivamente; A é a taxa de assimilação líquida de CO_2 ; R_d é a taxa de respiração no escuro e R_l é a taxa de produção de CO_2 em fotorrespiração.

2.2.5. Fluorescência da clorofila a

As variáveis de fluorescência da clorofila a foram obtidas com auxílio do IRGA (LI-6400xt, LI-COR) na mesma área da folha em que foram realizadas as medições das trocas gasosas. Para as avaliações as folhas foram adaptadas ao escuro para que os centros de reação estivessem completamente abertos (todos os aceptores primários oxidados) com perda de calor mínima. As variáveis de indução da fluorescência obtidas foram: fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m). A partir desses valores foi obtido o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII), $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Genty *et al.*, 1989). As variáveis da fase lenta de indução da fluorescência foram obtidas seqüencialmente com a aplicação de uma iluminação actínica e um pulso de luz actínica saturante para a determinação das variáveis: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'). A partir desses parâmetros foi possível calcular a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado, $F_0' = F_0 / [(F_m - F_0)/F_m + (F_0/F_m')]$ (Oxborough e Baker, 1997), para o cálculo do coeficiente de extinção fotoquímico pelo modelo *lake*, o qual fornece uma estimativa de centros de reações abertos do FSII, $q_L = (F_m' - F)/(F_m' - F_0') \cdot (F_0'/F)$ (Kramer *et al.*, 2004). O rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no PSII, $Y_{II} = (F_m' - F)/F_m'$; e os rendimentos quântico da dissipação de energia regulada, $Y_{NPQ} = (F/F_m') - (F/F_m)$ e da dissipação de energia não regulada, $Y_{NO} = F/F_m$, foram calculados de acordo com Genty *et al.* (1989) e Hendrickson *et al.* (2004). O Y_{II} foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons, $ETR = Y_{II} \cdot PAR \cdot 0,84 \cdot 0,5$ (Bilger *et al.*, 1995), onde PAR é o fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; 0,5 o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996); e, 0,84 o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer, 1981).

2.2.6. Determinação do malonaldeído

A concentração de malonaldeído (MDA) acumulado foi determinada em folhas de arroz, a partir da extração em ácido tricloroacético (TCA) (Hodges *et al.*, 1999). O macerado foi centrifugado e, a uma alíquota do sobrenadante, adicionou-se solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) em TCA. Um controle para cada amostra foi obtido sem a

adição de TBA. As soluções foram incubadas em banho-maria (90 °C, 20 min) e, após completa extração, as reações foram interrompidas em banho de gelo. Realizou-se a leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 400, 532 e 600 nm. Para o cálculo da concentração de MDA, inicialmente, a diferença entre os valores de 532 e 600 nm foram descontados dos mesmo valores obtidos pela reação sem adição de TBA, como segue:

$$A = [(Abs_{532}+TBA) - (Abs_{600}+TBA)] - [(Abs_{532}+TBA) - (Abs_{600}+TBA)]$$

Posteriormente, foi descontado o interferente de leitura em 400 nm:

$$B = [(Abs_{400}+TBA) - (Abs_{600}+TBA)] \times 0,0571$$

A partir das estimativas de A e B, o MDA foi quantificado pela equação:

$$MDA \text{ (nmol mL}^{-1}\text{)} = [A - B/157000] \times 10^6$$

Os valores de MDA foram expressos por matéria fresca.

2.2.7. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real (qPCR)

O RNA total foi extraído do material vegetal fresco, folhas e raízes, dos cultivares Canastra, BRSMG Curinga, BR-IRGA 409 e IRGA 419 utilizando o reagente Trizol (38 % de fenol ácido pH 4,5, 0,8 M tioceanato de guanidina; 0,4 M tioceanato de amônio; 0,1 M acetato de sódio pH 5,0; 5,0 % glicerol; água livre de RNAases tratada com dietil pirocarbonato, DEPC). Realizou-se uma centrifugação com cloreto de sódio (5 N) e clorofórmio P.A para separação das fases aquosa, contendo RNA, e orgânica, contendo proteínas e DNA. A precipitação do RNA contido na fase aquosa foi realizada com igual volume de isopropanol P.A. Em seguida realizou-se lavagem do RNA com etanol 75 %. Após a extração o RNA foi quantificado em nanocell acoplado ao espectrômetro e analisado em gel de agarose 0,8% (p/v), corado com *red gel*. Para o experimento de qRT-PCR foram utilizadas quatro repetições biológicas com três replicatas técnicas.

A síntese de cDNA foi realizada com 2 µg de RNA total, pré-tratado com 1 µl de DNase (50 U/µL, *Amplification GradeDnase I*, InvitrogenTM), incubada por 37 °C a 15 min; para retirar os possíveis contaminantes de DNA genômico e para tal foi utilizado o protocolo da Invitrogen seguindo as normas do fabricante. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando o kit SuperScriptTM *First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (InvitrogenTM), realizada em *thermomixer*. O cDNA foi armazenado a -20 °C.

Para a análise de expressão gênica foi utilizado a técnica de PCR em tempo real (StepOnePlusTM Real-Time PCR System, Applied Biosystem), com sistema de detecção

de fluorescência mix SYBR Green I (*Applied Biosystems*[®], California, USA). A reação foi realizada utilizando diluição da reação de síntese de cDNA de fita simples, solução contendo os primers (primer direto e inverso, 10 μ M), dNTP (5 mM), tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl₂ (50 mM), SYBR Green I (1:10000; Invitrogen), Platinum Taq DNA polimerase (5U/ μ l), ROX (Invitrogen) e H₂O estéril. As condições de amplificação foram: *hot start* a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C, com temperatura de anelamento entre 58 °C e 60 °C, conforme o T_m do primer, e temperatura de extensão 72 °C. Os valores de Ct foram calculados pelo programa Real Time PCR Miner v 2.2 (Zhao e Fernald, 2005; <http://www.miner.ewindup.info/>) a partir dos valores de fluorescência das reações. Para a normalização dos dados utilizou-se genes constitutivos selecionados pelo programa GeNorm v. 3.5, dentre os genes de *Oryza sativa* actina (*OsACT*), β -1, 3-glucanase (*OsGLU*), tubulina (*OsTUB*) e ubiquitina (*OsUBQ5*). Foram utilizados os métodos comparativos propostos por Zhao e Fernald (2005).

2.3. Análise Estatística

O delineamento experimental constituiu-se de blocos ao acaso, com quatro repetições. Os dados de trocas gasosas, fluorescência e expressão gênica foram submetidas à análise de variância e teste de Scott-Knott 5% de probabilidade, com auxílio do programa SAEG 9.0. As curvas A/Ci foram analisadas por regressão não-linear obtidas no programa SigmaPlot 10.0. Foram realizadas análises de correlações de Pearson, no qual foram identificadas as correlações do mineral ferro e todos os outros minerais pelo programa SAS v 9.0.

3. RESULTADOS

3.1. Teor de ferro nos tecidos

Os cultivares Canastra, BRSMG Curinga, BR-IRGA 409 e IRGA 419 apresentaram incremento significativo no teor de ferro, nas folhas e raízes, quando cultivados por sete dias sob 7 mM de sulfato ferroso com EDTA (Fig. 1). O cultivar BRSMG Curinga apresentou um acúmulo de ferro nas raízes das plantas tratadas 11,8 vezes superior às plantas controle ($350,3 \text{ mg.kg}^{-1}$), seguido pelos cultivares Canastra, BR-IRGA 409 e IRGA 419 com um acúmulo de ferro 7,7, 5,4 e 3,9 vezes superior aos controles, respectivamente.

Os cultivares IRGA 419 e BRSMG Curinga apresentaram maior acúmulo de ferro nas folhas, 8,2 e 7,7 vezes superior ao controle, respectivamente. A menor translocação de ferro foi observada no cultivar BR-IRGA 409, com teor de ferro na parte aérea 4 vezes ($547,00 \text{ mg.kg}^{-1}$) superior ao controle ($138,25 \text{ mg.kg}^{-1}$).

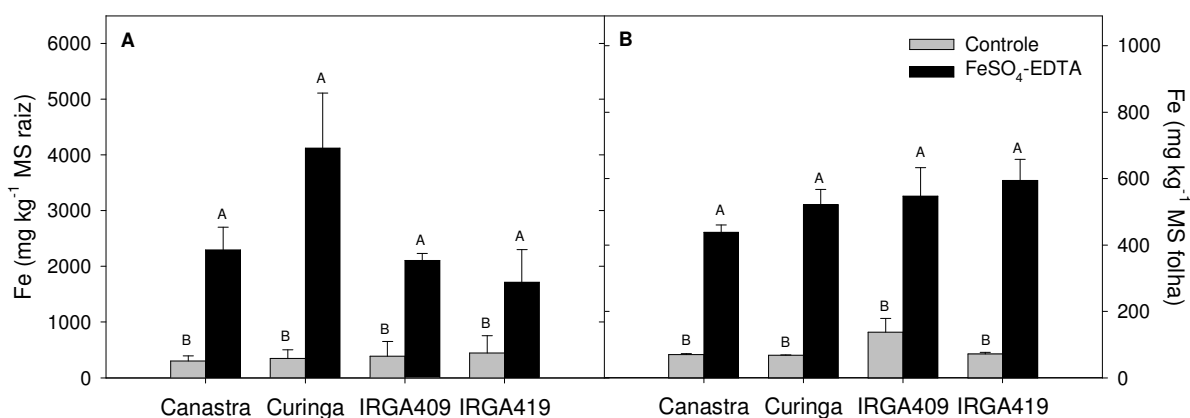


Figura 1. Teor de ferro (mg kg^{-1} MS) na raiz (A) e na parte aérea (B) de plantas de arroz, cultivares Canastra, BRSMG Curinga, BR-IRGA 409 e IRGA 419, submetidas ao FeSO_4 -EDTA (7 mM). Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

Analisando o ferro absorvido pelas plantas de arroz cultivadas sob excesso de ferro, verificou-se que a maior parte deste metal ficou acumulado nas raízes (Fig. 2). O ferro foi mais acumulado nas raízes do cultivar BRSMG Curinga (87 %), embora não seja verificada diferenças estatísticas em relação aos demais cultivares. A translocação de ferro para as folhas foi superior no cultivar IRGA 419 (31,1 %) seguido pelos cultivares: BR-IRGA 409 (20,6 %), Canastra (17,5 %) e BRSMG Curinga (12,9 %).

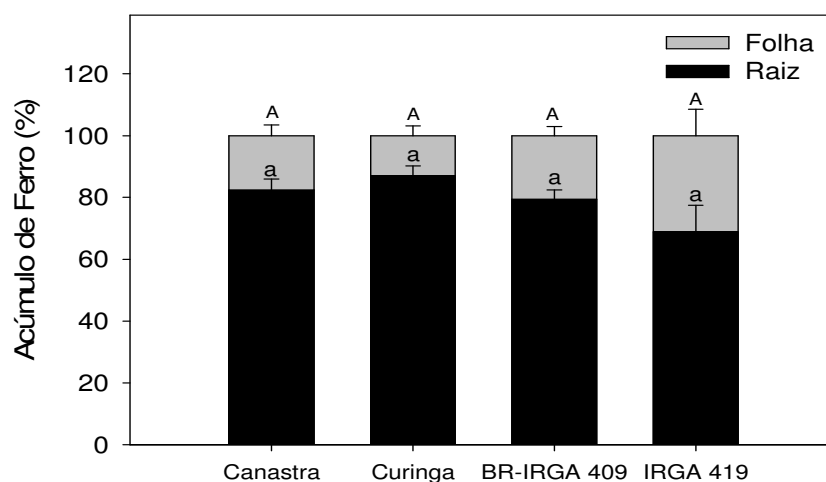


Figura 2. Acúmulo de ferro (%) nas raízes (■) e nas folhas (□) em cultivares de arroz Canastra, BRSMG Curinga, BR-IRGA 409 e IRGA 419 após sete dias de exposição ao $\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$ (7 mM). Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

3.2. Composição Mineral

A absorção e translocação de minerais, pelos cultivares de arroz, foram afetadas em resposta ao cultivo das plantas sob excesso de sulfato ferroso (Tabs. 1 e 2). O acúmulo dos minerais P, Zn e Sr, nas raízes, apresentou uma correlação positiva com o incremento de Fe na solução de cultivo (Tab. 1, Fig. 3A). O excesso de Fe promoveu uma correlação negativa e significativa com os minerais Mg, S, K e Rb, nas raízes de todos cultivares avaliados (Tab. 1)

O aumento no acúmulo de Fe nas folhas das plantas de arroz promoveu correlação positiva com Na e correlação negativa significativa com P, em todos os cultivares (Tab. 2, Fig. 3B). O acúmulo de P foi reduzido nas folhas de arroz das plantas cultivadas em sulfato ferroso (Fig. 3), em 30% nos cultivares BRSMG Curinga e BR-IRGA 409 e de 40 % nos cultivares Canastra e IRGA 419 (Tab. A3). O maior acúmulo de P nas raízes das plantas cultivadas sob excesso de ferro foi observado, em todos os cultivares analisados, pela razão de P nas folhas pelas raízes (Tab. 3).

Tabela 1. Correlação entre o teor de Fe e outros 17 elementos em raízes de quatro cultivares de *Oryza sativa*, cultivados sob excesso de sulfato ferroso (FeSO₄-EDTA, 7 mM), por sete dias, em sistema hidropônico.

Cultivar	B	Na	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd
Canastra	-0.917**	-0.743*	-0.867**	0.980**	-0.875**	-0.934**	-0.043 ^{ns}	-0.692 ^{ns}	-0.390 ^{ns}	-0.911**	-0.115 ^{ns}	0.847**	-0.523 ^{ns}	-0.855**	0.897**	0.525 ^{ns}	0.222 ^{ns}
BRSMG Curinga	-0.673 ^{ns}	-0.618 ^{ns}	-0.879**	0.987**	-0.796*	-0.968**	-0.251 ^{ns}	-0.695 ^{ns}	0.794*	-0.620 ^{ns}	0.820**	0.846**	-0.696*	-0.865**	0.942**	-0.056 ^{ns}	-0.755*
BR-IRGA 409	-0.799*	-0.822**	-0.792*	0.979**	-0.882**	-0.957**	-0.329 ^{ns}	0.663 ^{ns}	-0.798*	-0.739*	-0.668 ^{ns}	0.867**	-0.821**	-0.913**	0.856**	-0.347 ^{ns}	-0.641 ^{ns}
IRGA419	-0.864**	-0.869**	-0.907**	0.991**	-0.908**	-0.963**	-0.332 ^{ns}	0.046 ^{ns}	-0.735*	-0.698*	-0.925**	0.919**	-0.815**	-0.948**	0.938**	0.164 ^{ns}	-0.369 ^{ns}

* 5%; ** 1%; ^{ns} não significativo

Tabela 2. Correlação entre o teor de Fe e outros 17 elementos em folhas de quatro cultivares de *Oryza sativa*, cultivados sob excesso de sulfato ferroso (FeSO₄-EDTA, 7 mM), por sete dias, em sistema hidropônico.

Cultivar	B	Na	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd
Canastra	0.866**	0.847**	-0.435 ^{ns}	-0.766*	0.462 ^{ns}	-0.423 ^{ns}	-0.336 ^{ns}	-0.476 ^{ns}	0.806**	-0.572 ^{ns}	-0.135 ^{ns}	0.900**	-0.684 ^{ns}	-0.697*	-0.457 ^{ns}	-0.433 ^{ns}	-0.672 ^{ns}
BRSMG Curinga	0.133 ^{ns}	0.907**	-0.604 ^{ns}	-0.819*	-0.058 ^{ns}	-0.775*	-0.288 ^{ns}	-0.336 ^{ns}	0.671 ^{ns}	0.374 ^{ns}	-0.231 ^{ns}	0.920**	-0.742*	-0.870**	-0.396 ^{ns}	-0.379 ^{ns}	-0.358 ^{ns}
BR-IRGA409	0.759*	0.981**	-0.939**	-0.898**	0.302 ^{ns}	-0.875**	-0.661 ^{ns}	-0.775*	0.451 ^{ns}	-0.328 ^{ns}	-0.232 ^{ns}	0.732*	-0.503 ^{ns}	-0.878**	-0.777*	-0.676 ^{ns}	-0.493 ^{ns}
IRGA419	0.887**	0.903**	-0.814**	-0.848**	0.739*	-0.818**	-0.273 ^{ns}	-0.655 ^{ns}	0.032 ^{ns}	0.465 ^{ns}	0.432 ^{ns}	0.344 ^{ns}	-0.656 ^{ns}	-0.477 ^{ns}	-0.317 ^{ns}	-0.169 ^{ns}	-0.176 ^{ns}

* 5%; ** 1%; ^{ns} não significativo

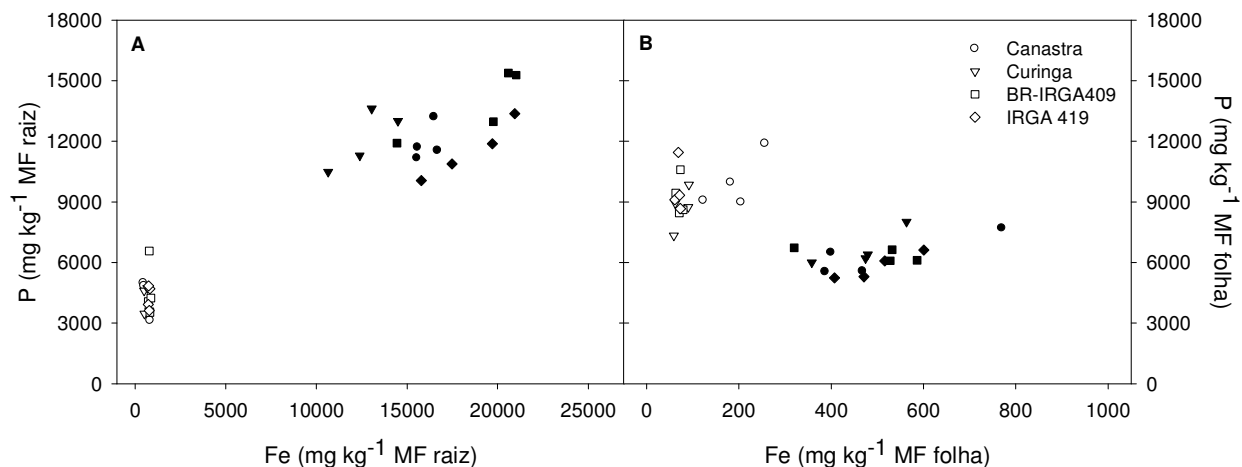


Figura 3. Teor de Fe em relação ao teor de P nas raízes (A) e folhas (B) dos cultivares de arroz: Canastra (○, Controle; ●, FeSO₄-EDTA), BRSMG Curinga (▽, Controle; ▼, FeSO₄-EDTA), BR-IRGA 409 (□, Controle; ■, FeSO₄-EDTA), IRGA 419 (◇, Controle; ◆, FeSO₄-EDTA) expostos ao excesso de ferro por sete dias, em solução hidropônica.

Tabela 3. Relação entre acúmulo de P nas folhas e raízes de plantas de arroz cultivadas em FeSO₄-EDTA (7 mM), por sete dias.

Genótipo	Tratamento	[P _{folha} /P _{raiz}]
Canastra	Controle	2,390 ± 0,47
	FeSO ₄ -EDTA	0,494 ± 0,04
BRSMG Curinga	Controle	2,163 ± 0,23
	FeSO ₄ -EDTA	0,510 ± 0,05
BR-IRGA 409	Controle	2,140 ± 0,29
	FeSO ₄ -EDTA	0,466 ± 0,03
IRGA 419	Controle	2,302 ± 0,25
	FeSO ₄ -EDTA	0,510 ± 0,05

3.3. Parâmetros de Trocas gasosas e Fotorrespiração

Todos os cultivares avaliados apresentaram redução na taxa de assimilação líquida de CO₂, quando submetidos à concentração excessiva de ferro. BRSMG Curinga apresentou a maior sensibilidade com 66 % de redução na A, em relação ao controle, seguidos pelo IRGA 419 (57 %), Canastra (54 %) e BR-IRGA 409 (49 %), (Figura 4). A queda fotossintética foi acompanhada pela redução na condutância estomática, sendo, em média, 62 % menor do que o apresentado pelas plantas controle; e, pela transpiração, em geral, 46 % menor nas plantas tratadas com sulfato ferroso. A relação Ci/Ca, no entanto, não apresentou alterações significativas ao nível de 5 % de

probabilidade, não diferindo entre as plantas controle e plantas tratadas em nenhum dos cultivares avaliados (Figura 4).

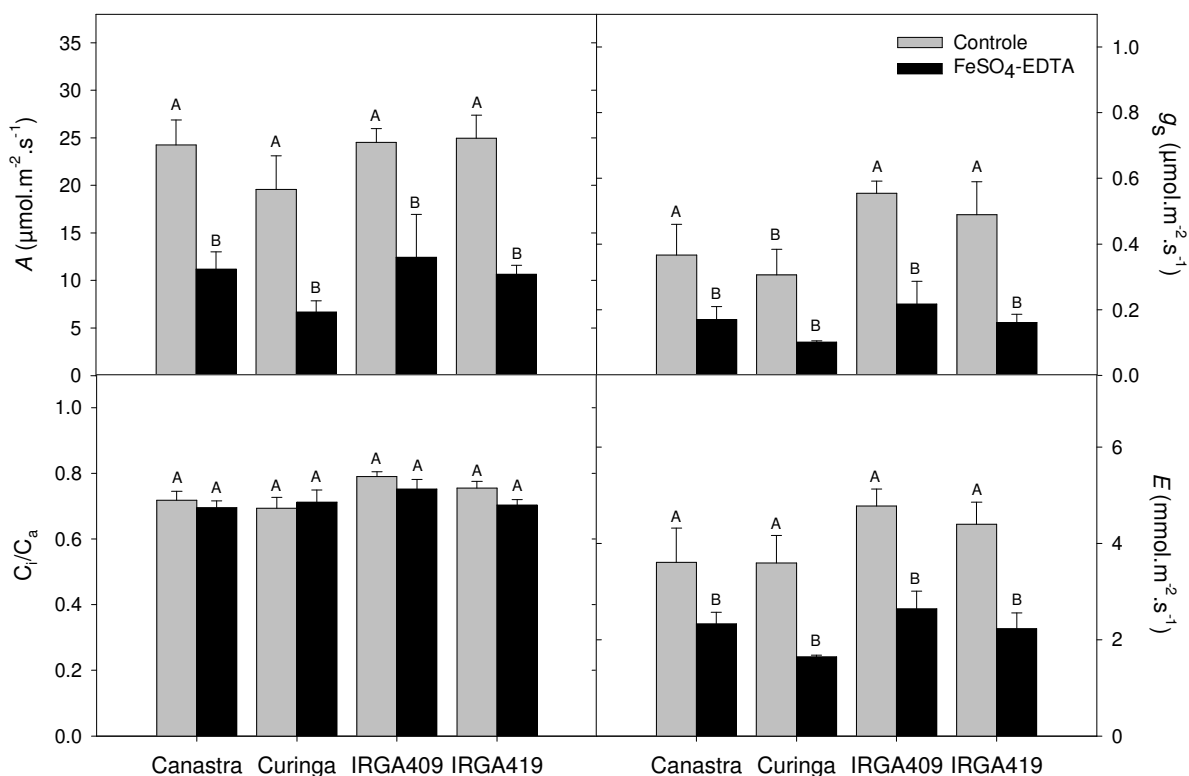


Figura 4. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A); condutância estomática (g_s); transpiração (E) e relação C_i/C_a em quatro cultivares cultivados sob 7 mM de sulfato ferroso, por sete dias, em sistema hidropônico. Barras representam médias ± EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott (p > 0,05).

Após sete dias de exposição ao ferro, as respostas da taxa de assimilação fotossintética em diferentes concentrações internas de CO₂ (curva A/C_i) foram significativas para todos cultivares avaliados (Figura 5). No entanto, a intensidade da resposta e o padrão fotossintético ao aumento de C_i foram distintos entre os cultivares.

A taxa de carboxilação máxima pela Rubisco foi afetada significativamente pelo excesso de ferro em plantas de arroz (Tab. 4). Os cultivares mais sensíveis foram BRSMG Curinga e IRGA 419 com 70 e 64 % de redução, em relação aos controles, respectivamente. Canastra tratado com sulfato ferroso apresentou uma redução em 39 % no V_{c,Max} e BR-IRGA 409 19 %. A J_{max} e V_{TPU} apresentaram reduções semelhante nos cultivares de arroz tratados com sulfato ferroso, com queda de, em média, 38 % no

cultivar BRSMG Curinga, seguido pelo Canastra (32 %), IRGA 419 (20 %) e BR-IRGA 409 (17 %).

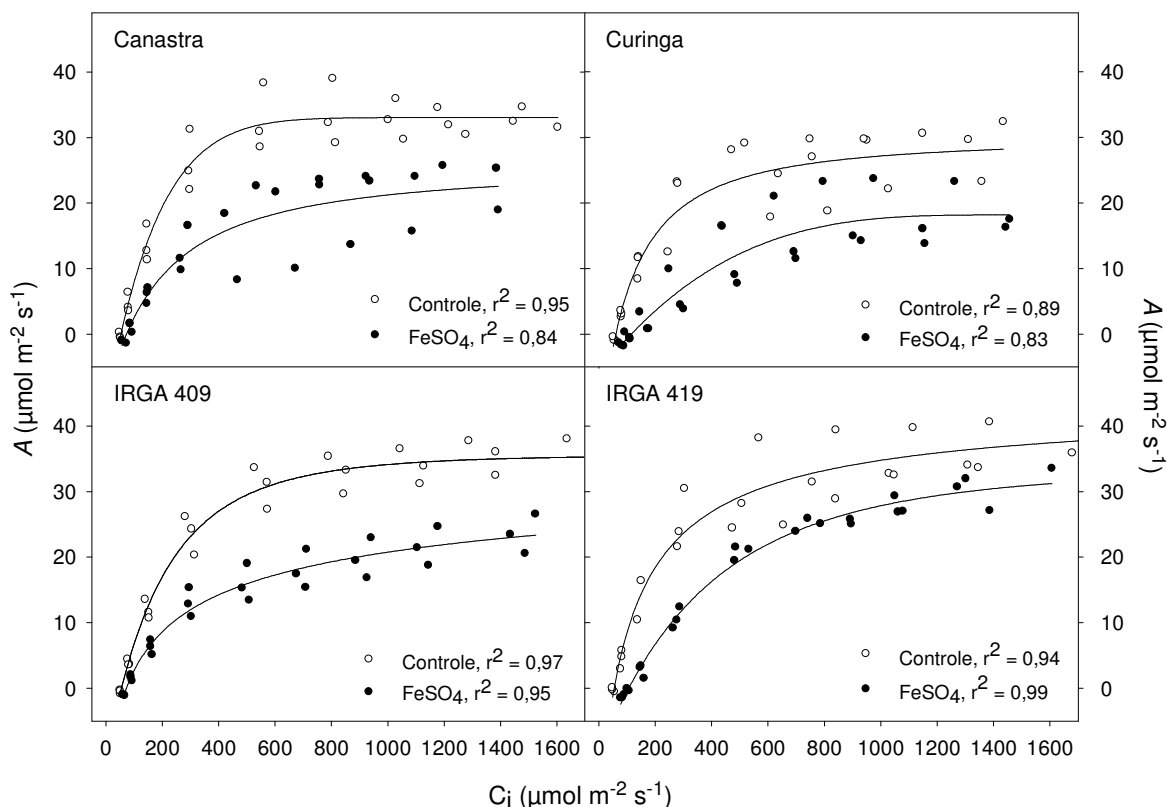


Figura 5. Regressão não-linear hiperbólica das curvas A/C_i em cultivares de arroz submetidos a 7 mM de sulfato ferroso por sete dias sob condição hidropônica. As equações das curvas estão descritas na tab. A4.

Tabela 4. Taxa de carboxilação máxima pela Rubisco ($V_{c,max}$), taxa de transporte de elétrons para regeneração da RuBP (J_{max}) e utilização da triose fosfato (V_{TPU}) em cultivares de arroz expostos ao $FeSO_4$ -EDTA (7 mM), por sete dias.

		$V_{c,max}$	J_{max}	V_{TPU}
Canastra	Controle	113.5 ± 10.3a	157.2 ± 13.5a	10.3 ± 0.38a
	FeSO ₄ -EDTA	68.9 ± 2.4b	100.9 ± 9.5a	7.5 ± 0.34b
BRSMG Curinga	Controle	106.5 ± 13.5a	120.3 ± 16.8a	8.8 ± 0.87a
	FeSO ₄ -EDTA	32.3 ± 8.9c	69.2 ± 14.6a	5.9 ± 0.85b
IRGA 409	Controle	104.5 ± 12.0a	154.6 ± 11.1a	11.6 ± 0.78a
	FeSO ₄ -EDTA	84.4 ± 12.3a	124.6 ± 25.9a	9.9 ± 1.54a
IRGA 419	Controle	105.1 ± 15.9a	149.5 ± 18.1a	11.5 ± 0.83a
	FeSO ₄ -EDTA	37.7 ± 4.0c	114.7 ± 1.5a	9.5 ± 0.54a

Médias±EP seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, para cada parâmetro, pelo teste de Scott-knott, 5 % de probabilidade.

A taxa total de transporte de elétrons (J_t) apresentou alteração nos cultivares de arroz expostos ao excesso de ferro (Tab. 5). O J_t apresentou redução em 31 % para os cultivares Canastra e BR-IRGA 409 e, em média, 38 % para os cultivares BRSMG Curinga e IRGA 419, em relação ao controle. A redução em J_t foi acompanhada pela diminuição no transporte de elétrons atribuídos às reações da carboxilase (J_c) da ribulose 1-5 bifosfato (RuBP). O J_c apresentou redução em 40 % nos cultivares Canastra e BR-IRGA 409, 46 % no IRGA 419 e em 51 % no cultivar BRSMG Curinga, em relação ao controle. O transporte de elétrons atribuído às reações da oxigenase (J_o) da RuBP e a taxa do CO_2 produzido pela fotorrespiração não foram afetadas em resposta ao ferro (Tab. 2). No entanto, a razão R/A foi significativamente alterada e aumentada em todos cultivares expostos ao ferro. O incremento na relação R/A foi de 100 % nos cultivares Canastra e IRGA 419, 120 % no BRSMG Curinga e 137 % no cultivar BR-IRGA 409, em relação aos respectivos controles.

Tabela 5. Taxa total de transporte de elétrons através do FSII da fotossíntese e fotorrespiração (J_t), elétrons atribuídos às reações de carboxilação (J_c) e oxigenase (J_o) da RuBP, razão J_c/J_t , taxa do CO_2 produzido pela fotorrespiração (R) e razão R/A em cultivares de arroz expostas ao sulfato ferroso (7 mM).

		J_t	J_c	J_o	J_c/J_t	R	R/A
Canastra	Controle	172±11.4a	126.3±11.8a	45.8±0.8a	0.73±0.020a	5.73±0.10a	0.24±0.03c
	FeSO ₄	118±7.9b	74.0±7.4b	43.6±1.8a	0.63±0.022b	5.45±0.22a	0.48±0.07b
BRSMG Curinga	Controle	161±9.4a	108.7±12.5a	52.3±3.2a	0.67±0.041a	6.54±0.40a	0.36±0.10c
	FeSO ₄	97±4.5b	53.8±4.6b	43.5±1.1a	0.55±0.023b	5.44±0.14a	0.79±0.12a
BR-IRGA 409	Controle	165±7.4a	124.7±6.3a	40.1±1.1a	0.76±0.005a	5.01±0.13a	0.20±0.01c
	FeSO ₄	114±21.9b	76.8±19.3b	37.0±3.3a	0.66±0.051b	4.62±0.42a	0.48±0.19b
IRGA 419	Controle	176±5.5a	129.3±8.2a	46.3±3.3a	0.74±0.025a	5.79±0.42a	0.23±0.04c
	FeSO ₄	111±4.0b	70.3±1.6b	40.6±4.9a	0.64±0.032b	5.08±0.62a	0.47±0.09b

Médias±EP seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, para cada parâmetro, pelo teste de Scott-knott, 5 % de probabilidade.

3.4. Parâmetros de Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* foi afetada, em plantas de arroz, pela imposição ao tratamento com sulfato ferroso (Figs. 6 e 7). Os parâmetros avaliados nas folhas adaptadas ao escuro, como o F_0 e F_v/F_m , no entanto, não apresentaram alterações significativas sob condição de toxidez por ferro. A taxa de transporte de elétrons, apresentou uma redução em 42 % no cultivar BRSMG Curinga exposto ao ferro, seguido pelo cultivar IRGA 409 (38 %), e BR-IRGA 409 e BRSMG Curinga, ambos com redução de 32 % no ETR (Fig. 6). A redução no ETR foi acompanhada pela

diminuição no q_L , o qual indica a estimativa de centros de reação oxidados. O q_L apresentou redução em 35 % para o cultivar BRSMG Curinga, 26 % para o IRGA 419, 22% para BR-IRGA 409 e 16 % para Canastra (Fig. 6).

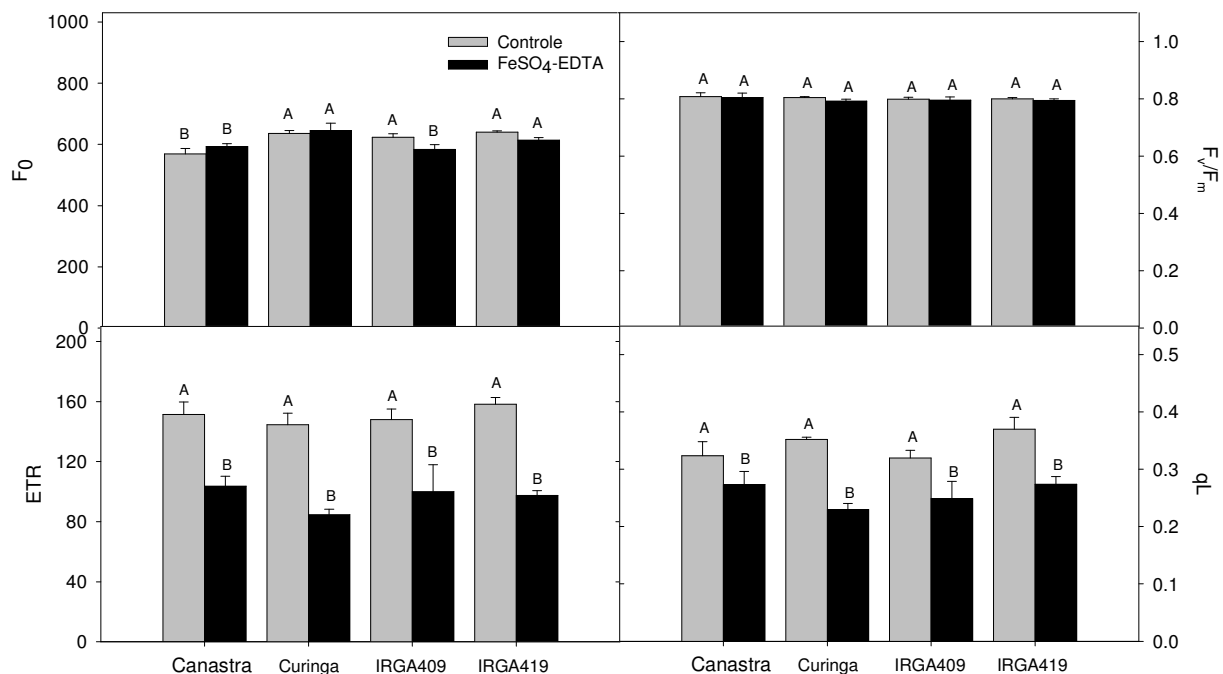


Figura 6. Fluorescência inicial (F_0), rendimento quântico potencial do PSII (F_v/F_m), taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) e estimativa de centros de reações abertos do FSII (q_L) em cultivares de arroz expostos as sulfato ferroso (7 mM). Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

Os rendimentos quânticos efetivo do fluxo linear de elétrons pelo PSII (Y_{II}), da dissipação de energia regulada (Y_{NPQ}) e da dissipação de energia não regulada (Y_{NO}) são complementares e estão representados na Fig. 7. As plantas cultivadas em condições adequadas de ferro apresentaram, de forma geral, proporção semelhante de aproveitamento da energia absorvida para a etapa fotoquímica (Y_{II}) e dissipada de forma regulada (Y_{NPQ}). As plantas de arroz, expostas ao excesso de ferro apresentaram diminuição do Y_{II} , em 32 % para os cultivares Canastra e BR-IRGA 409 e em 38 e 42 % para IRGA 419 e BRSMG Curinga, respectivamente. A redução em Y_{II} foi compensada pelo aumento do Y_{NPQ} , em 36 % para o cultivar BRSMG Curinga, 42 % para os cultivares Canastra e BR-IRGA 409 e em 50 % para o IRGA 419 (Fig. 6). O

rendimento quântico de energia não-regulado (Y_{NO}) não apresentou diferença significativa em plantas de arroz cultivadas sob excesso de ferro.

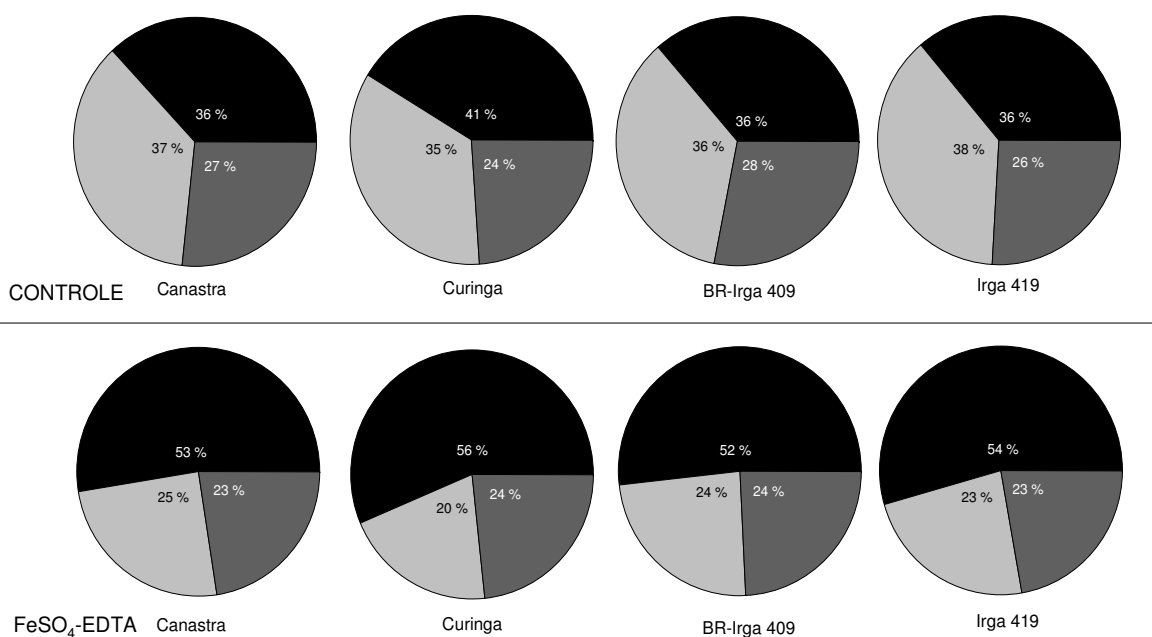


Figura 7. Rendimentos quânticos: efetivo do fluxo linear de elétrons pelo PSII (Y_{II} , ○), da dissipação de energia regulada (Y_{NPQ} , ●), e da dissipação de energia não regulada (Y_{NO} , ●) em cultivares de arroz expostos ao sulfato ferroso (7 mM).

3.5. Teor de aldeído malônico (MDA)

A quantificação de aldeído malônico (MDA), gerado pela peroxidação lipídica, foi maior nos cultivares submetidos ao ferro. O cultivar IRGA 419 apresentou maior teor de MDA (137 %), seguido por Canastra (81 %), BRSMG Curinga (62 %) e BR-IRGA 409 com um aumento de 55 %, em relação ao respectivo controle (Figura 8).

3.6. Expressão gênica

Como controle para a normalização dos dados do qRT-PCR foram utilizados os primers constitutivos dos genes ubiquitina (*OsUBQ5*) e tubulina (*OsTUB*) para análise das folhas dos cultivares Canastra, BRSMG Curinga, BR-IRGA 409 e IRGA 419. Para a análise da expressão gênica das raízes os dados foram normalizados utilizando os primers constitutivos dos genes actina (*OsACT*) e glutamina (*OsGLU*).

As raízes apresentaram menor padrão de expressão dos genes (Tab. 6), em relação às folhas de plantas de *Oryza sativa* (Tab. 7). O nível relativo de mRNA da ferritina

(*OsFER1*) foi aumentado, em resposta ao excesso de ferro, tanto nas raízes como nas folhas, com maior intensidade no cultivar IRGA 419.

Os genes associados ao transporte de ferro e outros nutrientes, como *Yellow Stripe Like 1* (*OsYSL1*), transportador de monossacarídeo do tonoplasto induzível por limitação de fosfato 1 (*OsP11*), sintetase da nicotianamina (*OsNAS1*), transferase da nicotianamina (*OsNAAT1*) apresentaram redução na expressão relativa das raízes de plantas de arroz cultivadas sob excesso de ferro (Tab. 6). Os mesmos genes foram expressamente induzidos nas folhas das plantas de arroz expostas ao excesso de ferro (Tab. 7), exceto o gene *OsNAS1* que não foi expresso nas folhas das plantas de arroz.

As folhas expostas ao estresse por ferro apresentaram nível relativo de mRNA do gene cloroplastídico *psbA* (*OspsbA*) reduzido, de forma mais expressiva nos cultivares IRGA 419, seguido pelo BR-IRGA 409 e BRSMG Curinga (Tab. 7). A expressão do gene *OsGS1* foi aumentado em plantas de arroz cultivadas em $\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$ (7 mM), de forma mais expressiva no cultivar Canastra.

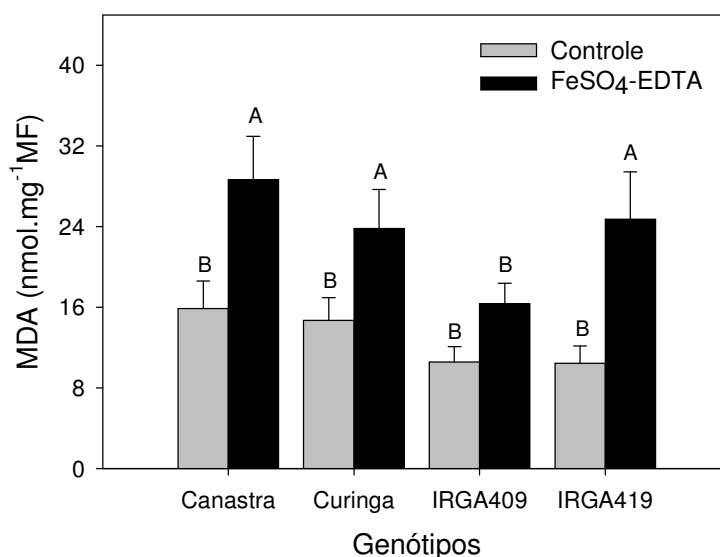


Figura 8. Teor de aldeído malônico (MDA) em folhas de cultivares de arroz submetidos a 7 mM de sulfato ferroso por sete dias, sob condição hidropônica. Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

Tabela 6. Análises por qRT-PCR do nível relativo de mRNA dos genes ferritina (*OsFER1*), transferase da nicotianamina (*OsNAATI*), sintetase da nicotianamina (*OsNASI*), transportador de monossacarídeo do tonoplasto induzível por limitação de fosfato 1 (*OsPII*), fator transcricional bHLH induzível por limitação de fosfato 1 (*OsPTF1*), *Yellow Stripe Like 1* (*OsYSL1*), em raízes dos cultivares de *Oryza sativa*, cultivados em diferentes fontes de ferro (7 mM), por sete dias.

		<i>OsFER1</i>	<i>OsNAATI</i>	<i>OsNASI</i>	<i>OsPII</i>	<i>OsPTF1</i>	<i>OsYSL1</i>
Canastra	Controle	1.84±0.394	2.524±0.467	57.824±6.075	6.522±0.963	10.274±1.311	5.296±0.319
	FeSO ₄	5.30±1.802	0.165±0.034	2.335±0.478	0.311±0.048	6.609±1.493	0.916±0.275
BRSMG	Controle	4.54±1.698	1.690±0.058	50.890±7.872	4.581±0.606	9.810±0.437	5.627±0.221
	Curinga	10.70±1.922	0.454±0.114	1.467±0.441	0.438±0.046	9.688±1.168	1.901±0.079
BR-IRGA 409	Controle	3.95±0.124	1.244±0.185	3.480±0.539	1.404±0.270	10.909±1.943	4.991±0.670
	FeSO ₄	11.63±1.922	0.172±0.026	1.381±0.418	0.232±0.035	6.242±0.876	2.415±0.339
IRGA 419	Controle	4.94±1.085	1.284±0.425	3.766±0.422	4.147±0.948	11.867±2.516	20.552±2.709
	FeSO ₄	23.34±4.957	0.298±0.060	0.464±0.059	0.514±0.062	12.497±3.165	2.883±0.405

Nível relativo de expressão gênica normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos actina e glutamina. Médias representam n=3 com três replicatas técnicas ± EP.

Tabela 7. Análises por qRT-PCR do nível relativo de mRNA dos genes da proteína Q-B cloroplastídica (*OspsbA*), ferritina (*OsFER1*), sintetase da glutamina citosólica (*OsGSI*), sintetase da nicotianamina (*OsNAS1*), transportador de monossacarídeo do tonoplasto induzível por limitação de fosfato 1 (*OsPII*), fator transcricional bHLH induzível por limitação de fosfato 1 (*OsPTF1*), *Yellow Stripe Like 1* (*OsYSL1*), em folhas dos cultivares de *Oryza sativa*, cultivados em diferentes fontes de ferro (7 mM), por sete dias.

		Nível Relativo de mRNA					
		<i>OspsbA</i>	<i>OsFER1</i>	<i>OsGSI</i>	<i>OsPII</i>	<i>OsPTF1</i>	<i>OsYSL1</i>
Canastra	Controle	19.8±4.1	7.3±2.6	1.41±0.11	0.180±0.018	0.145±0.024	2.59±0.43
	FeSO ₄	37.4±5.1	139.6±18.4	4.43±0.52	0.897±0.076	0.703±0.097	8.74±1.15
BRSMG	Controle	33.8±5.9	2.3±0.2	1.72±0.29	0.097±0.010	0.054±0.006	3.33±0.60
Curinga	FeSO ₄	28.1±4.6	145.0±16.1	2.35±0.35	0.277±0.040	0.245±0.035	10.09±2.05
BR-IRGA 409	Controle	34.0±8.4	12.3±3.6	3.66±0.37	0.090±0.013	0.031±0.004	4.97±0.44
	FeSO ₄	25.4±3.9	39.6±6.5	3.12±0.47	0.161±0.016	0.119±0.017	6.74±1.10
IRGA 419	Controle	39.9±7.4	2.4±0.1	3.79±0.33	0.139±0.012	0.093±0.011	8.00±0.96
	FeSO ₄	11.7±3.0	130.5±7.5	4.76±0.42	0.333±0.020	0.248±0.028	5.06±0.25

Nível relativo de expressão gênica normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos ubiquitina5 e tubulina. Médias representam n=3 com três replicatas técnicas ± EP.

4. DISCUSSÃO

A toxidez pelo ferro, é descrita em plantas de arroz em dosagens superiores a 300 mg kg⁻¹ MS (Dobermann e Fairhurst, 2000), caracterizada visualmente pelo bronzeamento, observado a partir do terceiro dia de exposição ao sulfato ferroso (dados não mostrados). O acúmulo de ferro nas raízes das plantas de arroz foi mais expressivo no cultivar Canastra, seguido pelo BRSMG Curinga, BR-IRGA 409 e IRGA 419 (Fig. 1). Em gramíneas, O Fe⁺² pode ser transportado para o interior das raízes, pela atuação do YSL (*Yellow stripe like*), o qual pode absorver metais a partir de complexos de nicotianamina e fitosideróforos (FS) (DiDonato Jr *et al.*, 2004; Schaaf *et al.*, 2004; Curie *et al.*, 2009). Dentre os 18 membros OsYSL identificados (Gross *et al.*, 2003; Koike *et al.*, 2004; Aoyama *et al.*, 2009), *OsYSL1* apresentou aumento na expressão das raízes com suprimento de Fe⁺³ e Fe⁺², ao passo que a expressão do mesmo gene nas folhas foi aumentado sob deficiência de ferro, em mutantes de arroz *naat1* (Cheng *et al.*, 2007). A expressão de *OsYSL1*, todavia, não foi observada em raízes e folhas de arroz por outros autores (Inoue *et al.*, 2009; Banerjee *et al.*, 2010). Sob cultivo em excesso de ferro, no entanto, nas condições experimentais vigentes, a expressão do gene *OsYSL1* foi reduzida nas raízes das plantas de arroz, de forma mais expressiva no cultivar Canastra e IRGA 419 (Tab. 3). A redução na expressão do gene relacionado à absorção de ferro possivelmente apresentou-se como um mecanismo inicial de exclusão de ferro na planta, o que, todavia, não foi capaz de impedir os altos teores de ferros nas raízes dos cultivares em estudo.

A síntese de fitosideróforos, com a participação das enzimas sintase da nicotianamina (NAS) e aminotransferase da nicotianamina (NAAT), é estimulada em meio deficiente em Fe (Shojima *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 1995; Higuchi *et al.*, 1999; Mori, 1999; Curie e Briat, 2003; Wu *et al.*, 2011), conferindo importante papel na homeostase de metais, como o ferro (DiDonato Jr *et al.*, 2004; Gendre *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2010). No entanto, o alto nível de expressão do gene *OsNAS1* em raízes dos cultivares Canastra e BRSMG Curinga, sob condições ideais de ferro (Tab. 6) sugere que os cultivares cultivados em ambiente de sequeiro apresentam uma informação genética preexistente para a expressão desses genes. Neste ambiente de cultivo, o ferro encontra-se na forma trivalente (Fe⁺³). Para absorver Fe⁺³, as plantas de arroz possivelmente induzem a expressão de genes envolvidos com a estratégia II de absorção de ferro, a qual consiste na liberação de FS e translocação complexo FS-Fe⁺³

sem a necessidade de redução extracelular (Curie *et al.*, 2001). No entanto, sob exposição ao excesso de ferro, o nível de mRNA do gene *OsNAS1*, nos mesmos cultivares, foi drasticamente reduzido nas raízes (Tab. 6), possivelmente devido uma tentativa de limitar a absorção excessiva deste metal, altamente disponível em condições alagadas. De forma semelhante, o gene *OsNAAT1* foi reduzido nos quatro cultivares quando cultivados sob exposição ao excesso de ferro (Tab. 6).

O cultivar Canastra apresentou menor acúmulo de ferro (2,6 vezes) nas folhas das plantas de arroz, em relação aos demais cultivares, com acúmulo de, em média, 6,8 vezes superior às plantas controle. O cultivar BRSMG Curinga tem sido descrito como um cultivar adaptado tanto para condições alagadas como sistema de sequeiro (Morais *et al.*, 2005). O excesso de ferro no meio de cultivo interferiu, ainda, na absorção de outros minerais. Os minerais P, Zn e Sr tiveram sua absorção aumentada nas raízes de plantas de arroz expostas ao excesso de ferro (Tab. 1). A acidificação do meio disponibiliza o Zn de frações insolúveis, permitindo maior absorção na forma de Zn^{+2} (Kirk e Bajita, 1995; Kobayashi e Nishi, 2008). O Zn pode ainda ser absorvido pelas raízes de arroz por transportadores de ferro, como membros da família IRT (*Iron Regulated Transporter*; Hell e Stephan, 2003) e da família ZIP (*ZRT/IRT-related Proteins*; ZRT, *Zinc Regulated Transporter*; Guerinot, 2000; Ramesh *et al.*, 2003).

O aumento nos níveis de P, em raízes de arroz, sob condições de excesso de Fe, promoveu redução na expressão do transportador de P, *OsP11*, de forma mais expressiva no cultivar Canastra (Tab. 6). As expressões de *OsP11* e *OsPTF1* são induzidas pela deficiência de fosfato nas raízes e constitutivamente expressas em folhas de arroz (Wasaki *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2005). O aumento da expressão do gene transportador de induzido por deficiência de P foram observados nas folhas de arroz, onde o teor de P foi reduzido, sob exposição ao excesso de ferro (Tab. 2 e 3). A alta translocação de Fe tem sido descrita por promover deficiência de P nas folhas de arroz (Mission *et al.*, 2005), decorrente limitação na translocação do P do apoplasto para o simplasto (Silveira *et al.*, 2007), o que evidencia a co-regulação dos transportadores de P e Fe (Hirsch *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2009). A alta concentração de ferro causou, ainda, um desbalanço nutricional através de efeitos antagonísticos na absorção dos minerais B, Na, Mg, S, K, Ni, As, e Co (Tab. 1), como observado por outros autores (Sahrawat, 2005; Silveira *et al.*, 2007).

A alta translocação de ferro nas folhas dos cultivares de arroz (Fig. 2), cultivados sob excesso de ferro, foi acompanhada pelo incremento nos níveis de mRNA de

OsYSL1, principalmente nos cultivares Canastra e BRSMG Curinga (Tab. 7). Uma vez na parte aérea, o transporte intercelular de ferro é afetado decorrente a expressão de genes da família YSL (Kim e Guerinot, 2007), conferindo um possível mecanismo de remobilização do excesso desse metal.

Uma vez no mesofilo, além da remobilização (DiDonato Jr *et al.*, 2004; Nishizawa, 2005), o ferro pode ser armazenado nos vacúolos ou incorporando à ferritina, (Briat *et al.*, 1995; Briat e Lobréaux, 1997; Majerus *et al.*, 2009; Briat *et al.*, 2010a). Esse mecanismo de proteção à toxidez por Fe foi confirmado nas plantas de arroz, através do aumento expressivo no nível de mRNA do gene *OsFER1*, tanto nas raízes (Tab. 6) quanto nas folhas (Tab. 7). Na parte aérea sempre esta indução foi maior e, a expressão de *OsFER1* foi mais expressiva nos cultivares BRSMG Curinga e IRGA 419, com aumento, em média, 59 vezes superior aos respectivos controle. *OsFER1* e *OsFER2* apresentaram níveis aumentados em folhas e raízes de arroz sob exposição do excesso de ferro (Stein *et al.*, 2009). O ferro, quando armazenado nas ferritinas não pode reagir com oxigênio, desempenhando, assim, um importante papel na defesa das plantas contra o estresse oxidativo induzido por ferro (Ravet *et al.*, 2009; Briat *et al.*, 2010b).

A não-compartimentação ou não-complexação do ferro nas folhas, no entanto, pode incorrer em aumento do risco oxidativo, em decorrência ao alto caráter reativo do elemento. Uma vez que a toxicidade por ferro é considerada como estresse oxidativo, os sistemas de defesa antioxidante intrínsecos também podem ser um fator importante à resistência à toxicidade (Suh *et al.*, 2002). O aumento de enzimas antioxidantes como a dismutase do superóxido e redutase da glutatona, além de antioxidantes não enzimáticos como manitol e glutatona reduzida foi observado em folhas de arroz cultivadas sob excesso de ferro (Fang *et al.*, 2001). Assim, o estresse severo pode ocasionar um desequilíbrio celular a favor de prooxidantes em detrimento aos antioxidantes, desencadeando o estresse oxidativo (Suh *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 1997; Becana *et al.*, 1998; Souza-Santos *et al.*, 2001). O estresse oxidativo pode ser observado nas plantas de arroz cultivadas sob excesso de ferro, a partir da quantificação de aldeído malônico (MDA), gerado pela peroxidação lipídica (Fang *et al.*, 2001). Dentre os cultivares avaliados, Canastra e IRGA 419 apresentaram níveis mais expressivos de MDA (Fig. 8). O estresse oxidativo mediado por ferro pode se difundir nos compartimentos celulares e causar danos severos em macromoléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (Halliwell e Gutteridge, 1984) e diminuição dos pigmentos

fotossintéticos (Terry, 1980; Spiller e Terry, 1980; Taylor *et al.*, 1982). A desestruturação de pigmentos dos complexos fotossintéticos ocasiona, por sua vez, a redução na taxa de assimilação líquida de CO₂ e, com isso, perda da capacidade de fixação de carbono nos cloroplastos (Scandalios, 1993; Suh *et al.*, 2002).

Os cultivares de arroz, cultivados sob excesso de ferro, apresentaram redução na taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), de forma mais acentuada no cultivar BRSMG Curinga. A queda fotossintética, nas plantas de arroz, foi acompanhada pela redução na condutância estomática (g_s), e pela transpiração, sem, no entanto, alteração na relação C_i/C_a (Fig. 4). Desta forma, a redução na g_s não foi o fator limitante da fotossíntese nas plantas de arroz. A redução na fotossíntese máxima observada com o aumento das concentrações internas de CO₂ (curva A/C_i), nas plantas cultivadas em sulfato ferroso, indica alterações na etapa bioquímica da fotossíntese (Fig. 5). Este fato pode ser confirmado pela redução na taxa máxima de carboxilação ($V_{c,max}$) pela enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) das plantas de arroz, de forma mais expressiva nos cultivares BRSMG Curinga e IRGA 419 (Tab. 4). A redução na atividade da carboxilase da rubisco tem sido descrita sob estresse severo de Fe (Taylor *et al.*, 1982), possivelmente pela degradação da subunidade maior da Rubisco por espécies reativas de oxigênio (Desimone *et al.*, 1996).

Os cultivares Canastra e BRSMG Curinga apresentaram reduções mais intensas na taxa de transporte de elétrons dirigidas à regeneração da ribulose 1,5-bifosfato (RuBP) (J_{max}) e utilização da triose fosfato (V_{TPU}). As trioses fosfato são formadas na etapa de redução do ciclo de Calvin, convertido a um intermediário utilizado na regeneração da RuBP. O funcionamento do ciclo de Calvin e absorção contínua de CO₂ necessitam que o seu aceptor, RuBP, seja constantemente regenerado (Rao *et al.*, 1989; Arulanantham *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 2000). A síntese triose fosfato a partir do CO₂, conhecida como etapa de redução do 3-fosfoglicerato, requer energia do ATP e equivalentes redutores na forma de NADH (Heldt e Heldt, 2005). Uma vez que o ATP utilizado é produzido na cadeia transportadora de elétrons, a taxa de transporte de elétrons torna-se o principal fator limitante na regeneração da RuBP (Farazdaghi, 2011). Dentre outros fatores, a limitação de P nas folhas dos cultivares de arroz cultivados em excesso de ferro (Tab. 2 e 3), elemento essencial para a síntese de ATP, pode, ainda, ter contribuído na diminuição mais expressiva na etapa da regeneração da RuBP. Além disso, a deficiência de P nas folhas de plantas de arroz tem sido associadas à redução na

fixação de CO₂, ocasionando um acúmulo de carboidratos solúveis e sacarose nas folhas (Yong-fu *et al.*, 2006).

A inibição do Ciclo de Calvin e a redução taxa de transporte de elétrons cloroplastídica, pela imposição do excesso de ferro, nas plantas de arroz, pode estar associada à diminuição no transporte de elétrons atribuídos às reações da carboxilase (J_c) da RuBP (Tab. 5), como observado, sob mesmo estresse, em *Beta vulgaris* (Terry, 1980). No entanto, não foi observado incremento no transporte de elétrons atribuído às reações da oxigenase (J_o) da RuBP nos cultivares de arroz. O que demonstra que a taxa de produção de CO₂ pela fotorrespiração não foi afetada em resposta ao ferro (Tab. 5). A fotorrespiração é a atividade oxigenativa da Rubisco, observada principalmente em plantas C₃, que acarreta em perdas de CO₂ dependente de luz (Ogren, 1984). Dentre outros fatores, as taxas fotorrespiratórias (R_1) aumentam quando a relação CO₂/O₂ diminui (Muraoka *et al.*, 2000), o que não foi observado em plantas de arroz cultivadas sob excesso de ferro (Fig. 4).

O gene *OsGS1*, o qual codifica a enzima sintetase da glutamina, apresenta três isoformas, dentre as quais, duas são altamente expressas em folhas de arroz (Tabuchi *et al.*, 2005). A enzima GS têm sido proposta por desempenhar papéis importantes no metabolismo do nitrogênio, dentre os quais, a reassimilação do amônio liberada na fotorrespiração (Lam *et al.*, 1996), a qual representa cerca de 90 % do fluxo por meio da rota GS/GOGAT nas folhas de plantas C₃ (Stitt *et al.*, 2002). Dentre os cultivares avaliados, sob excesso de ferro, o nível de mRNA de *OsGS1* foi expressivamente aumentado no cultivar Canastra (Tab. 7). A formação do 2-oxoglutarato, no entanto, limitante da atividade *in vivo* da GOGAT pode ser restrito em situações de estresse com baixas taxas de *turnover* do ciclo de Calvin (Stitt *et al.*, 2002). Desta forma, a fotorrespiração não pareceu ser um processo celular alternativo na dissipação de elétrons em cultivares de arroz cultivados sob excesso de ferro em meio hidropônico.

A diminuição induzida pelo estresse abiótico no funcionamento de enzimas do ciclo de Calvin também resulta em acúmulo de ATP e NADPH, levando a inibição do *feedback* de transporte de elétrons e aumento do gradiente de prótons transtilacoidal (Siedlecka *et al.*, 1997; Siedlecka e Krupa, 2004). Com isso, a redução no consumo de ATP gera uma saturação, bloqueando o dreno de elétrons na etapa fotoquímica, ocasionando redução na taxa de transporte de elétrons (ETR), a qual foi observada de forma mais expressiva nos cultivares BRSMG Curinga e IRGA 419 (Fig. 6). A redução no ETR foi acompanhada pela diminuição no q_L , o qual indica a estimativa de centros

de reação oxidados. A limitação no transporte de elétrons, pode proporcionar reatividade de radicais livres com o ferro disponível nas folhas, e afetar, via produção de EROs, a desestruturação de complexos protéicos fotossintéticos, como discutido anteriormente.

A perda da capacidade do FSII não está necessariamente vinculada ao decréscimo na aquisição de carbono (Behrenfel *et al.*, 1998). No entanto, o reparo de danos nos centros de reação do FSII através do *turnover* da proteína D1 é inibido quando o transporte de elétrons fotossintético é saturado e estimulado quando subsaturado (Gong e Ohad, 1991), levando a restauração do transporte de elétrons (Behrenfel *et al.*, 1998). Danos nos centros de reação do fotossistema II, com reparo ineficiente, podem ser sugeridos pela redução na expressão do gene *Osp5bA*, em plantas de arroz expostas ao excesso de ferro, de forma mais expressiva nos cultivares BR-IRGA 409 e IRGA 419 (Tab. 7). Danos na proteína D1 do FSII tem sido descritos em plantas sob estresse abiótico (Sundby *et al.*, 1993), como o excesso de ferro (Suh *et al.*, 2002). A síntese de novo da proteína D1 pode ser inibida pela interrupção do ciclo de Calvin (Takahashi e Murata, 2005; Nishiyama *et al.*, 2006), e pelo estresse oxidativo, onde a inibição da síntese *de novo* da proteína D1 é um fator primário e não o dano direto ao FSII (Nishiyama *et al.*, 2001).

A redução no fluxo linear de elétrons do FS II, em plantas de arroz, foi compensada pelo incremento na dissipação de energia pelo rendimento quântico da dissipação de energia regulada (Y_{NPQ}) quando expostas ao excesso de ferro (Fig. 7). Esse aumento na dissipação térmica tem sido observada em respostas iniciais às condições de estresse abiótico, onde a fixação de carbono é inibida, ocorrendo a partir da formação de um gradiente de pH pelo fluxo de elétrons cíclico (Golding e Johnson, 2003; Joliot e Joliot, 2006). A acidificação do lúmen do tilacóide (Baroli e Niyogi, 2000; Logan, 2005) é requerida para a ativação da enzima que converte violaxantina em zeaxantina, a qual é responsável pela re-emissão de energia na forma de calor (Havaux e Niyogi, 1999; Baroli e Niyogi, 2000; Smirnoff, 2005). A dissipação térmica ocorre pela alteração em sua conformação devida às ligações de prótons e da zeaxantina às proteínas da antena coletora de luz (Demmig-Adams e Adams, 1996; Horton *et al.*, 1996), e está envolvida na proteção do maquinário fotossintético contra a super-excitação (Krause e Weis, 1991; Ort e Baker, 2002) e proteção contra danos e/ou síntese *de novo* da proteína D1 do FSII (Jin *et al.*, 2003).

5. CONCLUSÕES

Os cultivares IRGA 419, indicado para ambiente irrigado, e BRSMG Curinga, adequado aos ambientes irrigado e de sequeiro, apresentaram alta sensibilidade ao excesso de ferro. Ambos os cultivares apresentaram aumento na dissipação térmica do excesso de energia e da expressão do gene *OsFER1*. Esses mecanismos, no entanto, não foram eficientes em impedir danos oxidativos e redução na fotossíntese desses cultivares.

Os cultivares Canastra e BR-IRGA 409 apresentaram efeitos tóxicos moderados em relação aos demais cultivares, em resposta à parâmetros fisiológicos e bioquímicos. O cultivar Canastra possivelmente apresentou mecanismo para limitar a translocação de ferro para as folhas. O menor acúmulo de ferro nas folhas do cultivar Canastra pode minimizar o estresse oxidativo e permitir aumento na expressão do gene *OspsbA*, como reparo do centro de reação do FSII.

O cultivar BR-IRGA 409 apresentou maior tolerância fisiológica ao excesso de ferro, dentre os cultivares avaliados, em condições de casa-de-vegetação.

Os parâmetros fisiológicos de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* são sensíveis e responsivos à toxidez por ferro em plantas de arroz. Dentre os parâmetros avaliados, a taxa fotossintética, a taxa de transporte de elétrons e o coeficiente de extinção fotoquímico mostraram-se mais sensíveis para a detecção da toxidez.

Desta forma, metodologias não invasivas podem ser aplicadas em campo, e permitir a realização de *screening* de cultivares de arroz de diferentes procedências, quanto a susceptibilidade ou não a níveis tóxicos de ferro. Isso proporciona selecionar, de forma rápida e simples, cultivares possivelmente mais resistentes ao ferro, o qual tem sido responsável pelo decréscimo na produção e qualidade dos grãos em cultivo irrigado.

6. ANEXOS

Tabela A1. Genes analisados de *Oryza sativa* com os respectivos *primers* utilizados.

GENES	Acesso NCBI*	Primers Fw/Rv 5'-3'	Tm (° C) Fw/Rv
<i>OsACT1</i>	NC_008397.2	GGTTCATCAAGAAGGGACCCGG TGGAGGTGTATCCTGATGCGACAA	57/58
<i>OsFER1</i>	NC_008404.2	GCACGCAGTAGCAATGGAGTGA AGCGGCGCCATGTTCCTTTT	58/58
<i>OsGLU</i>	NC_008397.2	ATCACATCGGCTACGGTCTT GGAGGCGACTGAGAAGGTC	53/54
<i>OsGS1</i>	NC_008395.2	TGACGCCACGACATCCTCGT CAATGGAGCAACCGGAGCGA	58/57
<i>OsNAAT1</i>	NC_008395.2	ATCGGCAACTACGCGTTGGG AGGTTTGAGTTCACCTGCCGG	58/57
<i>OsNAS1</i>	NC_008396.2	GCTGTGTCTCGCTGTCCGTG GGCACGGATCAATGCCCAGG	59/59
<i>OsPI1</i>	NC_008394.4	TCCTCTTACCCCAACAATGG TGGAGAAGGAAGACCTGCCAAA	55/56
<i>OspsbA</i>	NC_001320.1	CTGTGGGGTTCGCTTCTGCAAC TACTGGAGGGGCAGCGATGAA	58/57
<i>OsPTF1</i>	NC_008399.2	CGGCTGCAGAAATGTGCTGGA TGTGCAACAGGCACACAATAGCT	58/58
<i>OsTUB</i>	NC_008397.2	TACCGTGCCCTTACTGTTCC CGGTGGAATGTCACAGACAC	55/55
<i>OsUBQ5</i>	NC_008394.4	ACCACTTCGACCGCCACTACT ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	57/58
<i>OsYSL1</i>	NC_008397.2	GCTGAAAATAGCGCAAAATCCGTTG AGTTACTGCACTTTTGCGCAGTC	57/57

* Acesso obtido pelo BLASTN das sequências *foward* e *reverse*.

Tabela A2. Teor (mg kg^{-1}) de 18 elementos nas folhas de cultivares de *Oryza sativa*, cultivados sob excesso de sulfato ferroso (FeSO_4 -EDTA, 7 mM), por sete dias, em sistema hidropônico.

		B	Na	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe
Canastra	Controle	26.6 ± 0.94	26937 ± 3994	1669 ± 220	4431 ± 434	15470 ± 2047	24959 ± 2561	1709 ± 512	47.9 ± 7.250	585 ± 81
	FeSO_4	15.8 ± 1.54	16107 ± 790	715 ± 49	11910 ± 447	6517 ± 549	8873 ± 310	1666 ± 65	31.3 ± 0.747	16071 ± 298
BRSMG Curinga	Controle	22.3 ± 3.09	24049 ± 4192	1593 ± 207	4107 ± 326	15230 ± 2467	22426 ± 923	1680 ± 455	47.3 ± 4.349	616 ± 65
	FeSO_4	14.7 ± 1.30	15841 ± 1397	580 ± 43	12097 ± 728	7244 ± 762	10125 ± 920	1351 ± 51	33.6 ± 2.346	12646 ± 797
BR-IRGA 409	Controle	48.5 ± 7.51	46576 ± 5074	2545 ± 480	4602 ± 673	28628 ± 2851	30469 ± 1957	3144 ± 1205	25.1 ± 3.791	796 ± 31
	FeSO_4	20.9 ± 2.44	24292 ± 2334	932 ± 25	13883 ± 861	10973 ± 1580	11772 ± 725	2032 ± 106	33.3 ± 1.801	18958 ± 1525
IRGA 419	Controle	49.2 ± 7.61	48914 ± 5124	3047 ± 402	4270 ± 295	28610 ± 2639	40450 ± 3036	2104 ± 346	30.7 ± 3.893	769 ± 18
	FeSO_4	15.9 ± 2.32	23968 ± 1590	795 ± 37	11543 ± 712	11036 ± 1162	10018 ± 444	1739 ± 144	30.9 ± 0.846	18475 ± 1148
		Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd
Canastra	Controle	0.391 ± 0.027	0.86 ± 0.074	7.49 ± 0.99	32.80 ± 6.56	0.32 ± 0.024	1.60 ± 0.187	2.12 ± 0.347	2.89 ± 0.302	0.329 ± 0.070
	FeSO_4	0.362 ± 0.009	0.37 ± 0.051	7.05 ± 0.96	60.03 ± 2.03	0.24 ± 0.042	0.84 ± 0.041	4.68 ± 0.410	3.47 ± 0.246	0.373 ± 0.051
BRSMG Curinga	Controle	0.454 ± 0.021	1.25 ± 0.335	8.69 ± 0.36	27.90 ± 6.85	0.38 ± 0.022	1.48 ± 0.087	1.93 ± 0.309	3.74 ± 0.429	0.387 ± 0.062
	FeSO_4	0.524 ± 0.013	0.49 ± 0.107	19.75 ± 3.16	54.22 ± 1.35	0.22 ± 0.051	0.96 ± 0.091	4.27 ± 0.352	3.69 ± 0.217	0.203 ± 0.013
BR-IRGA 409	Controle	0.453 ± 0.031	1.27 ± 0.284	15.69 ± 1.57	38.58 ± 4.75	0.43 ± 0.048	2.09 ± 0.203	3.15 ± 0.617	5.57 ± 0.469	0.646 ± 0.145
	FeSO_4	0.322 ± 0.046	0.39 ± 0.069	11.34 ± 1.77	62.65 ± 1.42	0.24 ± 0.032	0.94 ± 0.048	5.80 ± 0.377	4.88 ± 0.311	0.342 ± 0.055
IRGA 419	Controle	0.437 ± 0.037	0.87 ± 0.099	18.42 ± 1.52	39.70 ± 1.41	0.43 ± 0.073	2.46 ± 0.199	3.14 ± 0.239	5.57 ± 0.208	0.726 ± 0.162
	FeSO_4	0.285 ± 0.029	0.47 ± 0.113	8.23 ± 0.25	61.40 ± 5.26	0.18 ± 0.028	0.86 ± 0.027	5.13 ± 0.340	5.66 ± 0.187	0.572 ± 0.054

Tabela A3. Teor (mg kg⁻¹) de 18 elementos nas folhas de cultivares de *Oryza sativa*, cultivados sob excesso de sulfato ferroso (FeSO₄-EDTA, 7 mM), por sete dias, em sistema hidropônico.

		B	Na	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe
Canastra	Controle	40.0 ± 2.3	671 ± 129	9015 ± 566	9982 ± 673	6973 ± 428	81062 ± 5248	5694 ± 239	271 ± 10	191.4 ± 27.6
	FeSO ₄	51.7 ± 4.7	5425 ± 633	5646 ± 583	5871 ± 314	6947 ± 513	59242 ± 4028	3796 ± 504	185 ± 17	506.0 ± 89.8
BRSMG Curinga	Controle	34.1 ± 6.4	496 ± 42	5635 ± 561	8713 ± 522	6285 ± 67	73482 ± 6227	3791 ± 705	276 ± 44	75.8 ± 8.8
	FeSO ₄	34.8 ± 4.2	2951 ± 432	3980 ± 304	6205 ± 118	5899 ± 39	49079 ± 3266	2837 ± 401	215 ± 21	468.9 ± 42.2
BR-IRGA 409	Controle	35.8 ± 2.7	476 ± 42	6977 ± 14	9277 ± 489	6784 ± 67	81718 ± 3919	5596 ± 658	336 ± 29	71.7 ± 3.3
	FeSO ₄	48.5 ± 3.5	2698 ± 386	4712 ± 92	6389 ± 169	7365 ± 24	56702 ± 1440	3915 ± 180	225 ± 8	491.6 ± 58
IRGA 419	Controle	36.0 ± 3.3	629 ± 110	7472 ± 27	9640 ± 620	6386 ± 17	83942 ± 3065	4977 ± 338	303 ± 21	68.7 ± 2.7
	FeSO ₄	56.3 ± 5.0	2112 ± 324	5527 ± 29	5808 ± 329	7502 ± 55	60432 ± 3112	4512 ± 331	237 ± 22	499.0 ± 40
		Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd
Canastra	Controle	0.072 ± 0.004	0.724 ± 0.069	12.83 ± 0.49	49.99 ± 4.42	0.675 ± 0.12	2.704 ± 0.174	2.377 ± 0.042	4.051 ± 0.10	0.484 ± 0.05
	FeSO ₄	0.099 ± 0.005	0.480 ± 0.044	10.59 ± 1.09	86.68 ± 17.9	0.186 ± 0.02	1.819 ± 0.059	1.525 ± 0.182	2.294 ± 0.40	0.233 ± 0.06
BRSMG Curinga	Controle	0.081 ± 0.003	0.540 ± 0.063	13.17 ± 1.37	39.95 ± 2.38	0.414 ± 0.07	2.582 ± 0.201	1.526 ± 0.225	3.308 ± 0.76	0.360 ± 0.08
	FeSO ₄	0.095 ± 0.006	0.581 ± 0.086	11.89 ± 0.85	58.77 ± 4.52	0.198 ± 0.02	1.507 ± 0.051	1.129 ± 0.123	2.187 ± 0.30	0.275 ± 0.03
BR-IRGA 409	Controle	0.072 ± 0.004	0.678 ± 0.083	14.11 ± 1.11	46.96 ± 4.44	0.307 ± 0.04	2.570 ± 0.146	2.252 ± 0.156	3.303 ± 0.30	0.454 ± 0.09
	FeSO ₄	0.079 ± 0.006	0.637 ± 0.068	13.69 ± 0.63	68.35 ± 2.65	0.202 ± 0.03	1.703 ± 0.023	1.550 ± 0.055	2.337 ± 0.15	0.257 ± 0.04
IRGA 419	Controle	0.069 ± 0.005	0.625 ± 0.062	12.88 ± 0.31	50.56 ± 4.26	0.484 ± 0.10	2.494 ± 0.099	2.147 ± 0.073	2.599 ± 0.24	0.228 ± 0.08
	FeSO ₄	0.071 ± 0.003	0.705 ± 0.067	13.45 ± 0.47	54.68 ± 2.13	0.259 ± 0.03	2.133 ± 0.237	1.981 ± 0.236	2.407 ± 0.16	0.182 ± 0.02

Tabela A4. Equações hiperbólicas e coeficiente de determinação (R^2) das regressões não-lineares das curvas A/Ci em cultivares de arroz submetidos ao sulfato ferroso (7 mM), por sete dias.

Cultivar	Tratamento	Equação	R^2
Canastra	Controle	$y = 33,04-44,59/(1-0,0006.x)^{1/-0,1124}$	0,9549
	FeSO ₄ -EDTA	$y = 25,65-33,61/(1+0,0038.x)^{1/0,7542}$	0,8354
BRSMG Curinga	Controle	$y = 29,98-47,36/(1+0,0063.x)^{1/0,7023}$	0,8851
	FeSO ₄ -EDTA	$y = 18,19-23,89/(1-0,0007.x)^{1/-0,3009}$	0,8292
BR-IRGA 409	Controle	$y = 35,62-46,92/(1+0,0011.x)^{1/0,2161}$	0,9733
	FeSO ₄ -EDTA	$y = 45,88-62,14/(1+0,0294.x)^{1/3,7686}$	0,9471
IRGA 419	Controle	$y = 44,17-64,03/(1+0,0117.x)^{1/1,3243}$	0,9354
	FeSO ₄ -EDTA	$y = 33,59-43,83/(1+0,0006.x)^{1/0,2307}$	0,9877

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abichequer, A.D.; Bohnen, H (1998) Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 22: 21-26

Aoyama, T.; Kobayashi, T.; Takahashi, M.; Nagasaka, S.; Usuda, K.; Kakei, Y.; Ishimaru, Y.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2009) *OsYSL18* is a rice iron(III)-deoxymugineic acid transporter specifically expressed in reproductive organs and phloem of lamina joints. **Plant Molecular Biology** 70:681-692

Arulanantham, A.R.; Rao, I.M.; Terry, N. (1990) Limiting Factors in Photosynthesis VI. Regeneration of Ribulose 1,5-Bisphosphate Limits Photosynthesis at Low Photochemical Capacity. **Plant Physiology** 93: 1466-1475

Asada, K. (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biological Science** 355: 1419-1431

Audebert, A.; Fofana, M. (2009) Rice Yield Gap due to Iron Toxicity in West Africa. **Journal of Agronomy & Crop Science** 195: 66-76

Backhausen, J.E.; Kitzmann, C.; Horton, P.; Scheibe, R. (2000) Electron acceptors in isolated intact chloroplasts act hierarchically to prevent over reduction and competition for electrons. **Photosynthesis Research** 64:1-13

Banerjee, S.; Sharma, D.J.; Verulkar, S.B.; Chandel, G. (2010) Use of *in silico* and semiquantitative RT-PCR approaches to develop nutrient rich rice (*Oryza sativa* L.). **Indian Journal of Biotechnology** 9: 203-212

Baroli, I.; Niyogi, K.K. (2000) Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B** 355: 1385-1394

Becana, M.; Moran, J.-F.; Iturbe-Ormaetxe, I. (1998) Iron-dependant oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stresses: toxicity and antioxidant protection. **Plant Soil** 201: 137-147

Behrenfeld, M.J.; Prasil, O.; Kolber, Z.S.; Babin, M.; Falkowski, P.G. (1998) Compensatory changes in Photosystem II electron turnover rates protect photosynthesis from photoinhibition. **Photosynthesis Research** 58: 259-268

Bilger, W.; Schreiber, U.; Bock, M. (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia** 102: 425-432

Briat, J.-F.; Curie, C.; Gaumard, F. (2007) Iron utilization and metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 10: 276-282

Briat, J.-F.; Duc, C.; Ravet, K., Gaynard, F. (2010a) Ferritins and iron storage in plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1800: 806-814

Briat, J.-F.; Fobis-Loisy, I.; Grignon, N.; Lobreaux, S.; Pascall, N.; Savino, G.; Thoirion, S.; von Wiren, N.; Wuytswinkel, O. (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. **Biology of the Cell** 84:69-81

- Briat, J.-F.; Lobréaux, S. (1997) Iron Transport and storage in plants. **Trends in Plant** 2: 187-193
- Briat, J.-F.; Ravet, K.; Arnaud, N.; Duc, C.; Boucherez, J.; Touraine, B.; Cellier, F.; Gaymard, F. (2010b) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. **Annals of Botany** 105: 811-822
- Cheng, L.; Wan, F.; Shou, H.; Huang, F.; Zheng, L.; He, F.; Li, J.; Zhao, F.-J.; Ueno, D.; Ma, J.F.; Wu, P. (2007) Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe(II) acquisition system and led to iron accumulation in rice. **Plant Physiology** 145: 1647-1657
- Counce, P.; Keisling, T.C.; Mitchell, A.J. (2000) A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science** 40: 436-443
- Cruz, J.A.; Avenson, T.J.; Kanazawa, A.; Takizawa, K.; Edwards, G.E.; Kramer, D.M. (2004) Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. **Journal of Experimental Botany** 56 (411): 395-406
- Curie, C.; Briat, J.F. (2003) Iron transport and signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology** 54: 183-206
- Curie, C.; Cassin, G.; Couch, D.; Divol, F.; Higuchi, K.; Jean, M.L.; Misson, J.; Schikora, A.; Czernic, P.; Mari, S. (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. **Annals of Botany** 103: 1-11
- Curie, C.; Panaviene, Z.; Loulergue, C.; Dellaporta, S.L.; Briat, J.-F.; Walker, E.L. (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. **Nature** 409: 346-349
- Demmig-Adams, B.; Adams, W.W (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. **Trends in Plant Science** 1(1): 21-26
- Desimone, M.; Henke, A.; Wagner, E. (1996) Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. **Plant Physiology** 111: 789-796
- Dhir, B.; Sharmila, P.; Saradhi, P.P. (2008) Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 20(1): 61-70
- DiDonato Jr, R.J.; Roberts, L.A.; Sanderson, T.; Eisley, R.B.; Walker, E.L. (2004) Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. **The Plant Journal** 39: 403-414
- Dobermann, A.; Fairhurst, T. (2000) Toxicidad de hierro en arroz. *In*: Dobermann, A.; Fairhurst, T. (Eds.). **Rice: nutrient disorders & nutrient management**. Potash and Phosphate Institute and International Rice Research Institute. p. 1-4
- Ehleringer, J. (1981) Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. **Oecologia** 102: 366-370

- Epron, D.; Godard, D.; Cornic, G.; Genty, B. (1995) Limitation of net CO₂ assimilation rate by internal resistances to CO₂ transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. & *Castanea sativa* Mill.). **Plant, Cell and Environment** 18: 43-51
- Fageria, N.K.; Santos, A.B.; Barbosa Filho, M.P.; Guimarães, C.M. (2008) Iron toxicity in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition** 31: 1676-1697
- Fang, W.; Wang, J.; Lin, C.; Kao, C. (2001) Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation** 35: 75-80
- Farazdaghi, H. (2011) The single-process biochemical reaction of Rubisco: A unified theory and model with the effects of irradiance, CO₂ and rate-limiting step on the kinetics of C₃ and C₄ photosynthesis from gas exchange. **Biosystems** 103(2): 265-284
- Gendre, D.; Czernic, P.; Conéjéro, G.; Pianelli, K.; Briat, J.-F.; Lebrun, M.; Mari, S. (2006) TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine- Ni/Fe transporter. **The Plant Journal** 49: 1-15
- Genon, J.; Hepcée, N.; Duffey, J.; Delvaux, B.; Hennebert, P. (1994) Iron toxicity and other chemical soil constraints to rice in highland swamps of Burundi. **Plant and Soil** 166: 109-115
- Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta** 990: 87-92
- Golding, A.J.; Johnson, G.N. (2003) Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. **Planta** 218: 107-114
- Gong, H.; Ohad, I. (1991) The PQ/PQH₂ ratio and occupancy of Photosystem II-QB site by plastoquinone control the degradation of Å1 protein during photoinhibition *in vivo*. **The Journal of Biology Chemistry** 266: 21293-21299
- Gross, J.; Stein, R.J.; Fett-Neto, A.G.; Fett, J.P. (2003) Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology** 26: 477-497
- Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta** 1465: 190-198
- Guerinot, M.L.; Yi, Y. (1994) Iron: nutritious, noxious, and not readily available. **Plant Physiology** 104: 815-820
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal** 219: 1-14
- Havaux, M.; Niyogi, K.K. (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 96: 8762-8767
- Heber, U. (2002) Irrungen, Wirungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C₃ plants. **Photosynthesis Research** 73: 223-231
- Heber, U.; Bukhov, N.G.; Shuvalov, V.A.; Kobayashi, Y.; Lange, O.L. (2001) Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves and poikilohydric mosses and lichens. **Journal of Experimental Botany** 52(363): 1999-2006

- Heldt, H.-W.; Heldt, F. (2005) **The Calvin cycle catalyzes photosynthetic CO₂ assimilation**. In: Heldt, H.-W. (ed.) *Plant Biochemistry* (3 Ed.) p. 165-193
- Hell, R.; Stephan, U.W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta** 216: 541-551
- Hendrickson, L.; Furbank, R.T.; Chow, W.S. (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. **Photosynthesis Research** 82: 73-81
- Higuchi, K.; Suzuki, K.; Nakanishi, H.; Yamagushi, H.; Nishisawa, N.K.; Mori, S. (1999) Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. **Plant Physiology** 119: 471-479
- Hirsch, J.; Marin, E.; Floriani, M.; Chiarenza, S.; Richaud, P.; Nussaume, L.; Thibaud, M.C. (2006) Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in Arabidopsis plants. **Biochimie** 88: 1767-1771
- Hodges, D.M.; DeLong, J.M.; Forney, C.F.; Prange, R.K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta** 207: 604-611
- Horton, P.; Ruban, A.V.; Walters, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 47:655-84
- Jin, E.; Yokthongwattana, K.; Polle, J.E.W.; Melis, A. (2003) Role of the Reversible Xanthophyll Cycle in the Photosystem II Damage and Repair Cycle in *Dunaliella salina*. **Plant Physiology** 132: 352-364
- Joliot, P.; Joliot, A. (2006) Cyclic electron flow in C₃ plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1757: 362-368
- Kim, S.A.; Guerinot, M.L. (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. **FEBS Letters** 581: 2273-2280
- Kirk, G.J.D.; Bajita, J.B. (1995) Root-induced iron oxidation, pH changes and zinc solubilization in the rhizosphere of lowland rice. **New Phytologist** 131: 129-137
- Koike, S.; Inoue, H.; Mizuno, D.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. **The Plant Journal** 39: 415-424
- Kobayashi, T.; Nakanishi, H.; Nishizawa, K. (2010) Recent insights into iron homeostasis and their application in graminaceous crops. **Proceedings of the Japan Academy B** 86: 900-913
- Kobayashi, T.; Nishi, N.K. (2008) **Regulation of iron and zinc uptake and translocation in rice**. Section IV.3. In: Hirano, H.-Y.; Hirai, A.; Sano, Y.; Sasaki, T. (Eds.) *Rice Biology in the Genomics Era. Biotechnology in Agriculture and Forestry* 62. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 321-335
- Kramer, D.M.; Johnson, G.; Kiirats, O.; Edwards, G.E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. **Photosynthesis Research** 79: 209-218
- Krause, G.H.; Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 42:313-349

- Lahner, B.; Gong, T.; Mahmoudian, M.; Smith, E.L.; Abid, K.B.; Rogers, E.E.; Guerinot, M.L.; Harper, I.F.; Ward, J.M.; Meintyre, L.; Schroeder, J.I.; Salt, D.E. (2003) Genomic scale profiling of nutrients and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology** 21:1215-1225
- Laisk, A.; Loreto, F. (1996) Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. **Plant Physiology** 110: 903-912
- Lam, H.-M.; Coschigano, K.T.; Oliveira, I.C.; Melo-Oliveira, R.; Coruzii, G.M. (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 47: 569-593
- Liu, H.; Zhang, J.; Christiec, P.; Zhang, F. (2008) Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. **Science of the Total Environment** 394: 361-368
- Logan, B.A. (2005) **Reactive oxygen species and photosynthesis**. In: Smirnoff, N. (Ed.) Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd. p. 250-267
- Long, S.P.; Bernacchi, C.J. (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. **Journal of Experimental Botany** 54 (392): 2393-2401
- Lupínková, L.; Komenda, J. (2004) Oxidative modifications of the photosystem II D1 protein by reactive oxygen species: from isolated protein to cyanobacterial cells. **Photochemistry and Photobiology** 79(2): 152–162
- Ma, J.F.; Shinada, T.; Matsuda, C.; Nomoto, K. (1995) Biosynthesis of phytosiderophores, mugineic acids, associated with methionine cycling. **The Journal of Biological Chemistry** 270:16549-16554
- Majerus, V.; Bertin, P.; Lutts, S. (2009) Abscisic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. **Plant Soil** 324: 253-265
- Majerus, V.; Bertin, P.; Swenden, V.; Fortemps, A.; Lobréaux, S.; Lutts, S. (2007) Organ-dependent responses of the African rice to short-term iron toxicity: ferritin regulation and antioxidative responses. **Biologia Plantarum** 51: 303-312
- Maxwell, K.; Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany** 51 (345): 659-668
- Melis, A.; Spangfort, M.; Andersson, B. (1987) Light-absorption and electron-transport balance between photosystem II and photosystem I in spinach chloroplasts. **Photochemistry and Photobiology** 45: 129-136
- Mishra, S.; Dubey, R.S. (2005) **Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants**. Cap 45 p. 832-850. In: Pessaraki, M. (Ed.) Handbook of Photosynthesis. 2 Ed. 862 p
- Misson, J.; Raghothama, K.G.; Jain, A.; Jouhet, J.; Block, M.A.; Bligny, R.; Ortet, P.; Creff, A.; Somerville, S.; Rolland, N.; Doumas, P.; Nacry, P.; Herrerra-Estrella, L.; Nussaume, L.; Thibaud, M.-C. (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate

deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102 (33): 11934-11939

Mitchell, R.A.C.; Theobald, J.C.; Parry, M.A.J.; Lawlor, D.W. (2000) Is there scope for improving balance between rubp-regeneration and carboxylation capacities in wheat at elevated CO₂? **Journal of Experimental Botany** 51: 391-398

Morais, O.P.; Castro, E.M.; Soares, A.A.; Guimarães, E.P.; Chatel, M.; Ospina, Y.; Lopes, A.M.; Pereira, J.A.; Utumi, M.M.; Centeno, A.C.; Fonseca, J.M.; Breseghello, F.; Guimarães, C.M.; Bassinello, P.Z.; Prabhu, A.S.; Ferreira, E.; Souza, N.R.G.; Souza, M.A.; Reis, M.S.; Santos, P.G. (2005) **BRSMG Curinga: Cultivar de arroz de terras altas de ampla adaptação para o Brasil**. Comunicado Técnico 114: Embrapa Arroz e Feijão p. 1-8

Mori, S. (1999) Iron acquisition by plants. **Current Opinion in Plant Biology** 2: 250-253

Muraoka, H.; Tang, Y.; Terashima, I.; Koizumi, H.; Washitani, I. (2000) Contributions of diffusional limitation, photoinhibition and photorespiration to midday depression of photosynthesis in *Arisaema heterophyllum* in natural high light. **Plant, Cell and Environment** 23: 235-250

Nishiyama, Y.; Allakhverdiev, S.I.; Murata, N. (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta** 1757: 742-749

Nishiyama, Y.; Yamamoto, H.; Allakhverdiev, S.I.; Inaba, M.; Yokota, A.; Murata, N. (2001) Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. **The Embo Journal** 20: 5587-5594

Nishizawa, N.K. (2005) The uptake and translocation of minerals in rice plants. Session 3: Opportunities and challenges of transgenic rice. p 90-93. *In*: Toriyama, K.; Heong, K.L.; Hardy, B. (Eds.) **Rice is life: scientific perspectives for the 21st century**. Proceedings of the World Rice Research Conference held in Tokyo and Tsukuba: Japan 590 p

Ogren, W. L. (1984) Photorespiration pathways, regulation and modification. **Annual Review of Plant Physiology** 35: 415-442

Olaleye, A.O.; Ogunkunle, A.O.; Singh, B.N.; Odeleye, F.O. Dada, O.A.; Senjobi, B.A. (2009) Elemental Composition of Two Rice Cultivars under Potentially Toxic on Aquept and Aquent. **Notulae Scientia Biologicae** 1: 46-49

Olaleye, A.O.; Tabi, F.O.; Ogunkunle, A.O.; Singh, B.N.; Sahrawat, K.L. (2001) Effect of toxic iron concentrations on the growth of lowlands rice. **Journal of Plant Nutrition** 24: 441 - 457

Ort, D.R.; Baker, N.R. (2002) A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? **Current Opinion in Plant Biology** 5:193-198

Ottow, J.C.G.; Benckiser, G.; Watanabe, I.; Santiago, S. (1983) Multiple nutritional soil stress as the prerequisite for iron toxicity of wetland rice (*Oryza sativa* L.). **Tropical Agriculture** 60: 102-106

Oxborough, K.; Baker, N.R. (1997) An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at the cellular and sub-cellular levels of organization. **Plant, Cell and Environment** 20: 1473-1483

Pereira, E.G. (2009) **Efeitos tóxicos do ferro: alterações fisiológicas e morfológicas em plantas cultivadas e de restinga**. Tese de Doutorado: Universidade Federal de Viçosa. 117 p

Pereira, E.G.; Oliva, M.A.; Kuki, K.N.; Cambraia, J. (2009) Photosynthetic changes and oxidative stress caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. **Trees** 23: 277-285

Ponnamperuma, F.N. (1972) The chemical of submerged soils. **Advances in Agronomy** 24: 29-96

Ramesh, S.A.; Shin, R.; Eide, D.J.; Schachtman, D.P. (2003) Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. **Plant Physiology** 133: 126-134

Rao, I.M.; Arulanantham, A.R.; Terry, N. (1989) Leaf Phosphate Status, Photosynthesis and Carbon Partitioning in Sugar Beet. II. Diurnal Changes in Sugar Phosphates, Adenylates, and Nicotinamide Nucleotides. **Plant Physiology** 90(3): 820-826

Ravet, K.; Touraine, B.; Boucherez, J.; Briat, J.-F.; Gaymard, F.; Cellier, F. (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. **The Plant Journal** 57: 400-412

Sahrawat, K.L. (2005) Managing iron toxicity in lowland rice: the role of tolerant genotypes and plant nutrients. Session 15: Challenges to expanding rice production in unfavorable environments, p 452-254. In: Toriyama, K.; Heong, K.L.; Hardy, B. (Eds.) **Rice is life: scientific perspectives for the 21st century**. Proceedings of the World Rice Research Conference held in Tokyo and Tsukuba, Japan 590 p

Scandalios, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology** 101: 7-12

Schaaf, G.; Ludewig, U.; Erenoglu, B.E.; Mori, S.; Kitahara, T.; von Wirén, N. (2004) ZmYS1 Functions as a Proton-coupled Symporter for Phytosiderophore- and Nicotianamine-chelated Metals. **The Journal of Biological Chemistry** 279 (10): 9091-9096

Sharkey, T.D.; Bernacchi, C.J.; Farquhar, G.D.; Singsaas, E.L. (2007) In Practice: Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. **Plant, Cell and Environment** 30 (9): 1035-1040

Shojima, S.; Nishizawa, N.K.; Tushiya, S.; Nozoe, S.; Trifune, T.; Mori, S. (1990) Biosynthesis of phytosiderophores In vitro by biosynthesis of 2''-deoxymugineic acid from l-methionine and nicotianamine **Plant Physiology** 93:1497-1503

Siedlecka, A.; Gardestrom, P.; Samuelson, G.; Oquist, G.; Gardestrom, P. (1997) Primary carbon metabolism in *Phaseolus vulgaris* plants under Cd/Fe interaction. **Plant Physiology and Biochemistry** 35: 951-957

Siedlecka, A.; Krupa, Z. (2004) Rubisco activity maintenance in environmental stress conditions: How many strategies? **Cellular and Molecular Biology Letters** 9: 56-57

- Silveira, V.C.; Oliveira, A.P.; Sperotto, R.A.; Amaral, L.; Dias, J.F.; Cunha, J.B.; Fett, J.P. (2007) Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 19: 127-139
- Sinha, S.; Gupta, M.; Chandra, P. (1997) Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: response of antioxidants. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 38: 286-291
- Smirnoff, N. (2005) **Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions.** In: Smirnoff, N. (Ed.) Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd. p. 53-86
- Snowden, R.; Wheeler, B.D. (1995) Chemical changes in selected wetland plant species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. **New Phytologist** 131: 503-520
- Sousa, R.O.; Gomes, A.S.; Vahl, L.C. (2004) **Toxidez por ferro em arroz irrigado.** In: Gomes, A.S.; Magalhães Jr. (eds.) Arroz Irrigado no Sul do Brasil: Empraba Informação Tecnológica. p. 305-337
- Souza-Santos, P.; Ramos, R.S.; Ferreira, S.T.; Carvalho-Alves, P.C. (2001) Iron induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta** 1512: 357-366
- Spiller, S.; Terry, N. (1980) Limiting Factors in Photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. **Plant Physiology** 65: 121-125
- Stein, R.J.; Ricachenevsky, F.K.; Fett, J.P. (2009) Differential regulation of the two rice ferritin genes (*OsFER1* and *OsFER2*). **Plant Science** 177: 563-569
- Stitt, M.; Müller, C.; Matt, P.; Gibon, Y.; Carillo, P.; Morcuende, R.; Scheible, W.-R.; Krapp, A. (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue 53(370): 959-970
- Suh, H.-J.; Kim, C.S.; Lee, J.-Y.; Jung, J. (2002) Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. **Photochemistry and Photobiology** 75(5): 513-518
- Sundby, C.; McCaffery, S.; Anderson, J.M. (1993) Turnover of the photosystem II D1 protein in higher plants under photoinhibitory and nonphotoinhibitory irradiance. **The Journal of Biological Chemistry** 268 (34): 25476-25482
- Tabuchi, M.; Sugiyama, K.; Ishiyama, K.; Inoue, E.; Sato, T.; Takahashi, H.; Yamaya, T. (2005) Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking *OsGSI;1*, a cytosolic glutamine synthetase1;1. **The Plant Journal** 42: 641-651
- Takahashi, S.; Murata, N. (2005) Interruption of the Calvin cycle inhibits the repair of Photosystem II from photodamage. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics** 1708 (3): 352-361
- Taylor, G.J.; Crowder, A.A. (1983) Use of the DCB technique for extraction of hydrous iron oxides from roots of wetland plants. **American Journal of Botany** 70: 1254-1257
- Taylor, S.E.; Terry, N.; Huston, R.P. (1982) Limiting Factors in Photosynthesis. III. Effects of iron nutrition on the activities of three regulatory enzymes of photosynthetic carbon metabolism. **Plant Physiology** 70: 1541-1543

Terry, N. (1980) Limiting Factors in Photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. **Plant Physiology** 65: 114-120

Valentini, R.; Epron, D.; De Angelis, P.; Matteucci, G.; Dreyer, E. (1995) In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. **Plant, Cell and Environment**, 18:631-640

Wasaki, J.; Yonetani, R.; Shinano, T.; Kai, M.; Osaki, M. (2003) Expression of the *OsP11* gene, cloned from rice roots using cDNA microarray, rapidly responds to phosphorus status. **New Phytologist** 158: 239-248

Wingler, A.; Lea, P.J.; Quick, W.P.; Leegood, R.C. (2000) Photorespiration: Metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Science** 355:1517-1529

Wu, J.; Wang, C.; Zheng, L.; Wang, L.; Chen, Y.; Whelan, J.; Shou, H. (2011) Ethylene is involved in the regulation of iron homeostasis by regulating the expression of iron-acquisition-related genes in *Oryza sativa*. **Journal of Experimental Botany** 62(2): 667-74

Yi, K.; Wu, Z.; Zhou, J.; Du, L.; Guo, L.; Wu, Y.; Wu, P. (2005) *OsPTF1*, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. **Plant Physiology** 138: 2087-2096

Yong-fu, L.; An-cheng, L.; Hassan, M.J.; Xing-hua, W. (2006) Effect of phosphorus deficiency on leaf photosynthesis and carbohydrates partitioning in two rice genotypes with contrasting low phosphorus susceptibility. **Rice Science** 13(4): 283-290

Zhao, S.; Fernald, R.D. (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology** 12(8): 1045-62

Zheng, L.; Huang, F.; Narsai, R.; Wu, J.; Giraud, E.; He, F.; Cheng, L.; Wang, F.; Wu, P.; Whelan, J.; Shou, H. (2009) Physiological and Transcriptome Analysis of Iron and Phosphorus Interaction in Rice Seedlings. **Plant Physiology** 151: 262-274

CAPÍTULO 3

BASES FISIOLÓGICAS PARA A SELEÇÃO DE CULTIVARES DE ARROZ TOLERANTES A TOXIDEX POR FERRO

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos visuais associados à toxidez por ferro incluem redução no tamanho das folhas, bronzeamento foliar, murcha das folhas, redução na ramificação radicular, flacidez e nanismo nas raízes que, em conjunto, depreciam o crescimento das plantas (Genon *et al.*, 1994; Yamauchi e Peng 1995; Thipyapong *et al.*, 2004). O excesso de ferro nas plantas de arroz promove necrose foliar, desbalanço catiônico, ocasionando desordem nutricional (Snowden e Wheeler, 1995; Silveira *et al.*, 2007). Esses sintomas são decorrentes da toxidez direta e indireta, que podem refletir na produtividade das cultivares (Bode *et al.*, 1995; Dobermann e Fairhurst, 2000). A toxidez direta, promovida pela absorção excessiva de ferro, ocasiona desestruturação celular e danos fisiológicos e bioquímicos. Por outro lado, a toxidez indireta resulta da deposição de Fe^{3+} nas raízes promovendo a formação de uma placa composta por óxidos ou hidróxidos de ferro a qual pode limitar a absorção do Fe e outros elementos (Taylor *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2007; Zhou e Shi, 2007; Liu *et al.*, 2007; 2008).

O excesso de ferro nos tecidos foliares, caracterizado por teores superiores a 300 mg kg^{-1} MS (Dobermann e Fairhurst, 2000), induz uma extensiva gama de desordens metabólicas, desencadeando estresse oxidativo (Sinha *et al.*, 1997; Eaton e Qian, 2002), que pode ser responsável por danos nos componentes fotossintéticos (Spiller e Terry, 1980; Suh *et al.*, 2002; Lupínková e Komenda, 2004). A desestruturação de pigmentos dos complexos fotossintéticos promove, por sua vez, alteração no transporte de elétrons, ocasionando redução na taxa de assimilação líquida de CO_2 e, com isso, perda da capacidade de fixação de carbono nos cloroplastos (Terry, 1980; Taylor *et al.*, 1982; Scandalios, 1993; Desimone *et al.*, 1996; Mishra e Dubey, 2005). Além disso, a deficiência de nutrientes como o P, Mg, nas folhas, dentre outras consequências, afetam a regeneração da RuBP (Farazdaghi, 2011) e ativação da Rubisco, respectivamente, ocasionando redução na taxa fotossintética por retroinibição (Heldt e Heldt, 2005).

As plantas dependem da capacidade de armazenar e remobilizar o ferro para adequado crescimento e minimizar sua toxicidade (Briat *et al.*, 2007). Mecanismos de dissipação do excesso de energia, a fim de evitar danos nos componentes celulares (Golding e Johnson, 2003; Cruz *et al.*, 2004; Mishra e Dubey, 2005; Joliot e Joliot, 2006), além de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos contra o estresse oxidativo gerado pelo excesso de ferro (Vansuyt *et al.*, 1997; Becana *et al.*, 1998; Fang *et al.*,

2001; Majerus *et al.*, 2007) são utilizados pelas plantas. Dentre os mecanismos não enzimáticos, o ferro pode ser armazenado nos vacúolos (Briat e Lobréaux, 1997) ou imobilizado pela incorporação ferritina, a qual minimiza danos diretos e protege contra a possível formação de espécies reativas de oxigênio (Briat *et al.*, 1995; Murgia *et al.*, 2002; Zancani *et al.*, 2004).

O estudo fisiológico dos efeitos tóxicos do ferro em plantas de arroz tem sido importante na seleção de cultivares tolerantes e, ainda, auxiliará em estudos moleculares mais específicos para o melhoramento de plantas de arroz (Sousa *et al.*, 2004). A fotossíntese, principal processo fisiológico, diretamente relacionado à produtividade, tem sido estudada recentemente através da fluorescência da clorofila *a*. Esta análise permite, além de danos fotossintéticos, avaliar mecanismos de dissipação não fotoquímica (Baker, 2008), auxiliando na seleção de plantas fisiologicamente mais tolerantes. O cultivo de cultivares tolerantes tem sido o principal recurso para garantir a produtividade em ambientes com excesso de ferro (Audebert e Fofana, 2009). Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos tóxicos do ferro em cultivares de *Oryza sativa* e, realizar uma seleção de cultivares possivelmente tolerantes ao ferro, a partir da avaliação de parâmetros fisiológicos analisados de forma univariada e multivariada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Condições de cultivo e Aplicação do tratamento

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), cultivares ou linhagens BRS Atalanta, Canastra, CMG 1167, CMG 1174, BRSMG Conaí, BRSMG Curinga, IRGA 419, BRS Ourominas, BRS Pepita, BRSMG Relâmpago e BRSMG Seleta foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio comercial (10%) por 10 min e germinadas em câmara de crescimento ($27\pm 2^\circ\text{C}$) por 7 dias no escuro e 7 dias com fotoperíodo de 12 h. As plântulas foram transferidas para solução nutritiva de Hoagland (pH 4,0, força total) em casa-de-vegetação. O pH foi ajustado a cada dois dias e a solução renovada semanalmente.

Após aproximadamente trinta dias, as plantas, no estágio V5 de desenvolvimento fenológico (Counce *et al.*, 2000), foram tratadas com sulfato ferroso (FeSO_4 , 7 mM) com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (p/p), concentração previamente definida (Pereira, 2009). Foi realizado em paralelo um tratamento controle em solução nutritiva com concentrações fisiológicas de ferro (0,019 mM). Cada tratamento foi constituído por quatro repetições, sendo o pH ajustado diariamente a 4,0 e a solução renovada a cada 4 dias. As avaliações foram realizadas após sete dias de exposição ao excesso de ferro.

2.2. Variáveis avaliadas

2.2.1. Composição mineral do material vegetal

Para a quantificação do teor de nutrientes nas folhas e raízes, amostras do material a fresco foram secas e moídas em moinho tipo Wiley. Para eliminar qualquer interferência na quantificação de nutrientes na matéria seca das raízes, estas foram previamente lavadas em solução contendo 3 % de ditionito de sódio (p/v), 0,3 M de citrato de sódio e 1,0 M bicarbonato de sódio (Taylor e Crowder, 1983).

O material vegetal moído foi digerido em 1,5 mL de HNO_3 (*Fisher Trace Metal grade*) concentrado, à 118°C por 4 horas e em seguida diluídas em 16 mL de água analisado por *Thermo Elemental PQ Excell* ICP-MS. A análise da composição mineral foi realizada utilizando a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), de acordo com Lahner *et al.* (2003). O teor dos minerais (mg kg^{-1}) determinados foram: magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca); ferro (Fe), boro (B), cobalto (Co), manganês

(Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn) e alguns elementos traços como arsênio (As), cádmio (Cd), estrôncio (Sr) e rubídio (Rb).

A partir dos teores de ferro obtidos, calculou-se o acúmulo de Fe nas raízes (AR) (Liu *et al.*, 2008) e na parte aérea (AP) (Abichequer e Bohem, 1998) pela razão entre o conteúdo de ferro na parte aérea (CPA) ou nas raízes (CSR) pelo teor de ferro na planta inteira, como sendo:

$$AR (\%) = [CSR / (CPA + CSR)] * 100$$

$$AP (\%) = [CPA / (CPA+CSR)] * 100$$

2.2.2. Determinação das trocas gasosas

As medições de trocas gasosas foram realizadas em folhas completamente expandidas. As variáveis, taxa de assimilação fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E) e a razão entre concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) foram determinadas por um analisador de gás por infravermelho (IRGA; modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre 8:00 e 12:30 a.m., em casa-de-vegetação, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 (C_a) ($\sim 410 \mu\text{mol mol}^{-1}$), temperatura ($20 - 30 \text{ }^\circ\text{C}$) e umidade ambiente ($50 - 69 \%$).

2.2.3. Fluoresc\u00eancia da clorofila a

As vari\u00e1veis de fluoresc\u00eancia da clorofila a foram obtidas com aux\u00edlio do fluor\u00f4metro modulado Imaging-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany) na mesma \u00e1rea da folha em que foram realizadas as medi\u00e7\u00f5es das trocas gasosas. Os sinais de fluoresc\u00eancia em todos os pontos da \u00e1rea foliar analisada foram capturados por uma c\u00e2mera CCD (*Charge Coupled Device*) acoplada ao aparelho (Oxborough, 2004). Para as avalia\u00e7\u00f5es as folhas foram adaptadas ao escuro para que os centros de rea\u00e7\u00e3o estivessem completamente abertos (todos os aceptores prim\u00e1rios oxidados) com perda de calor m\u00ednima. As vari\u00e1veis de indu\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia obtidas foram: fluoresc\u00eancia inicial (F_0) e fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m). A partir desses valores foi obtido o rendimento qu\u00e2ntico potencial do fotossistema II (FSII), $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Genty *et al.*, 1989). As vari\u00e1veis da fase lenta de indu\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia foram obtidas seq\u00fcencialmente com a aplica\u00e7\u00e3o de uma ilumina\u00e7\u00e3o act\u00ednica e um pulso de luz act\u00ednica saturante para a determina\u00e7\u00e3o das vari\u00e1veis: fluoresc\u00eancia em amostra adaptada \u00e0 luz antes do pulso de

saturação (F) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m′). A partir desses parâmetros foi possível calcular a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado, F₀′ = F₀/[(F_m-F₀/F_m)+(F₀/F_m′)] (Oxborough e Baker, 1997), para o cálculo do coeficiente de extinção fotoquímico pelo modelo *lake*, o qual fornece uma estimativa de centros de reações abertos do FSII, q_L = (F_m′-F)/(F_m′-F₀′).(F₀′/F) (Kramer *et al.*, 2004). O rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no PSII, Y_{II} = (F_m′-F)/F_m′; e os rendimentos quântico da dissipação de energia regulada, Y_{NPQ} = (F/F_m′) - (F/F_m) e da dissipação de energia não regulada, Y_{NO} = F/F_m, foram calculados de acordo com Genty *et al.* (1989) e Hendrickson *et al.* (2004). O Y_{II} foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons, *ETR* = Y_{II}.*PAR*.0,84.0,5 (Bilger *et al.*, 1995), onde *PAR* é o fluxo de fótons (μmol m⁻² s⁻¹) incidente sobre a folha; 0,5 o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996); e, 0,84 o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer, 1981).

2.2.4. Determinações de pigmentos cloroplastídicos

Os teores de pigmentos (clorofila a, b e carotenóides) foram determinados utilizando como extrator o dimetilsulfóxido (DMSO), conforme descrito por Wellburn (1994). Dois discos foliares de 0,59 cm de diâmetro cada foram colocados em recipientes contendo 5 mL de DMSO, saturado com carbonato de cálcio e mantidos no escuro. Após 4 horas em banho-maria a 65°C, as absorbâncias dos extratos foram lidas em espectrofotômetro a 480; 649,1 e 665,1 nm, utilizando como branco o DMSO puro. Os teores dos pigmentos foram expressos por matéria fresca.

2.2.5. Determinação dos teores de malonaldeído

A concentração de malonaldeído (MDA) acumulado, a qual indica a peroxidação de lipídios, foi determinada em folhas de arroz, a partir da extração em ácido tricloroacético (TCA). O macerado foi centrifugado e, a uma alíquota do sobrenadante, adicionou-se solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) em TCA. Um controle para cada amostra foi obtido sem a adição de TBA. As soluções foram incubadas em banho-maria e, após completa extração, as reações foram interrompidas em banho de gelo. Realizou-se a leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 400, 532 e 600 nm. Para o cálculo da concentração de MDA, inicialmente, a diferença entre os valores de 532 e

600 nm foram descontados dos mesmos valores obtidos pela reação sem adição de TBA, segundo Hodges *et al.* (1999).

2.3. Análise Estatística

O delineamento experimental constituiu-se de blocos ao acaso, com quatro repetições. Os dados de trocas gasosas, fluorescência, pigmentos e malonaldeído foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Scott-Knott 5% de probabilidade, pelo programa SAEG v 9.0.

Os nutrientes foram analisados através da correlação de Pearson, no qual foram identificadas as correlações do mineral ferro e todos os outros minerais, pelo programa SAS v 9.0.

Para as análises multivariadas foi obtida a variação relativa para cada variável analisada, pela seguinte equação: $\text{Variação Relativa (\%)} = (\text{trat} - \text{contr}) / \text{contr} \times 100$. Os cultivares utilizados nesse trabalho foram agrupados, pelo método de variáveis canônicas, com base em 19 variáveis fisiológicas obtidas. Foi analisada a contribuição relativa dos caracteres para divergência pelo Método de Singh, a partir de médias não padronizadas. Para as técnicas de agrupamento de otimização, pelos métodos de Tocher e da ligação média entre grupo, UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*), os dados foram analisados pela distância generalizada de Mahalanobis, a qual apresenta vantagem de levar em consideração a correlação entre os caracteres considerados, utilizando as variâncias e covariâncias residuais, a partir da estimativa da distância de D^2 (Cruz *et al.*, 2011). As análises multivariadas foram realizadas com auxílio do programa GENES v 2007.0.0.

3. RESULTADOS

O cultivo de plantas em solução nutritiva com excesso de ferro ocasionou acúmulo excessivo deste metal nas raízes e folhas dos diferentes cultivares estudados. O acúmulo de ferro nas folhas foi até 5 vezes, superior às plantas controle, nos cultivares CMG 1174 e IRGA 419 (Fig. 1A). No entanto, o maior acúmulo de ferro nas raízes das plantas de arroz foi observado no cultivar BRSMG Seleta (22 vezes), seguido pelos cultivares CMG 1167 e Canastra, com 19 vezes e, BRSMG Relâmpago, IRGA 419 e BRS Pepita, em média, 16 vezes superior às raízes das plantas controle (Fig. 1A).

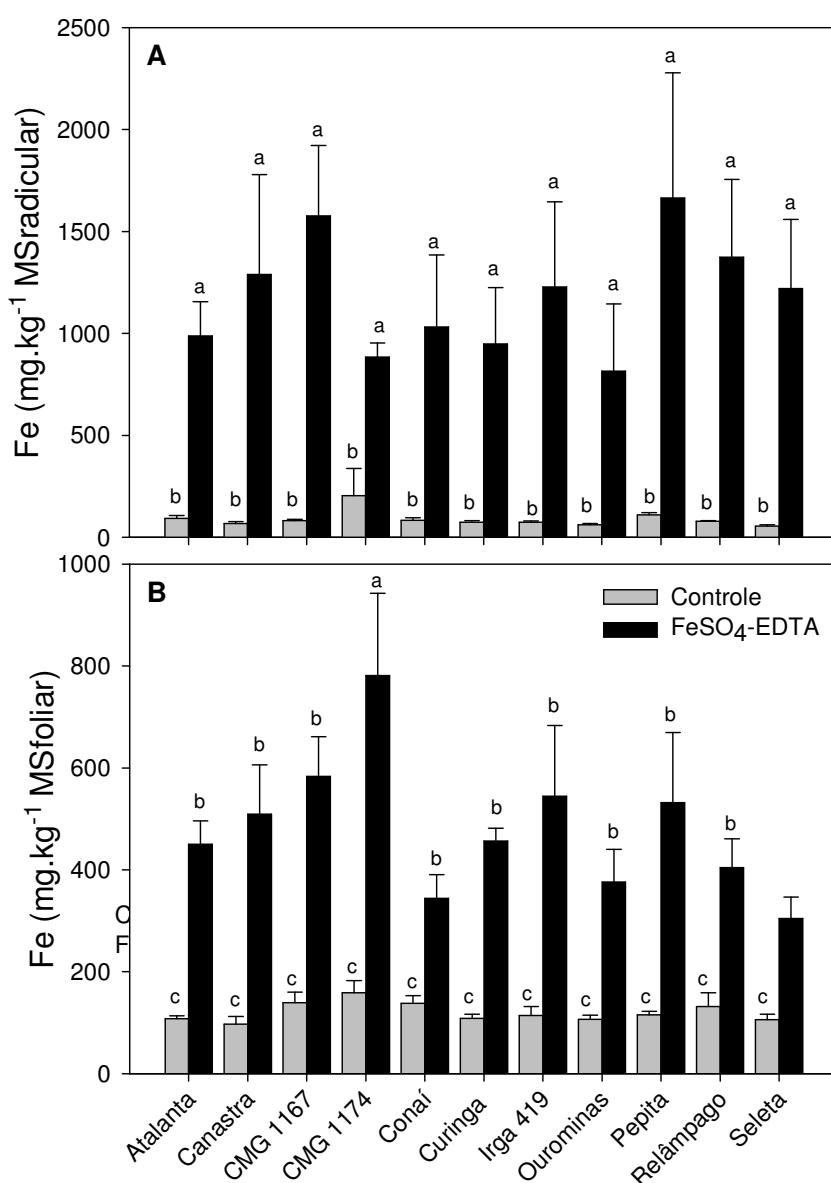


Figura 1. Teor de ferro nas raízes (A) e folhas (B) de cultivares de arroz cultivados sob FeSO₄-EDTA (7 mM), por sete dias, em solução. Barras representam médias ± EP. Médias seguidas de

mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

Os cultivares de arroz, cultivados sob excesso de ferro, apresentaram um maior acúmulo de ferro nas raízes em detrimento ao índice de translocação para as folhas (Fig. 2). Os cultivares BRSMG Seleta, BRSMG Relâmpago, BRS Pepita, BRSMG Conai e CMG 1167 retiveram acima de 70 % do total de ferro incorporado às plantas, em suas raízes, permitindo translocação de menos de 30 % para as folhas. A maior translocação de ferro para as folhas foi observada no cultivar CMG 1174 (46 %), seguido pelos cultivares BRSMG Curinga e BRSMG Ourominas (37 %) (Figs. 1B, 2)

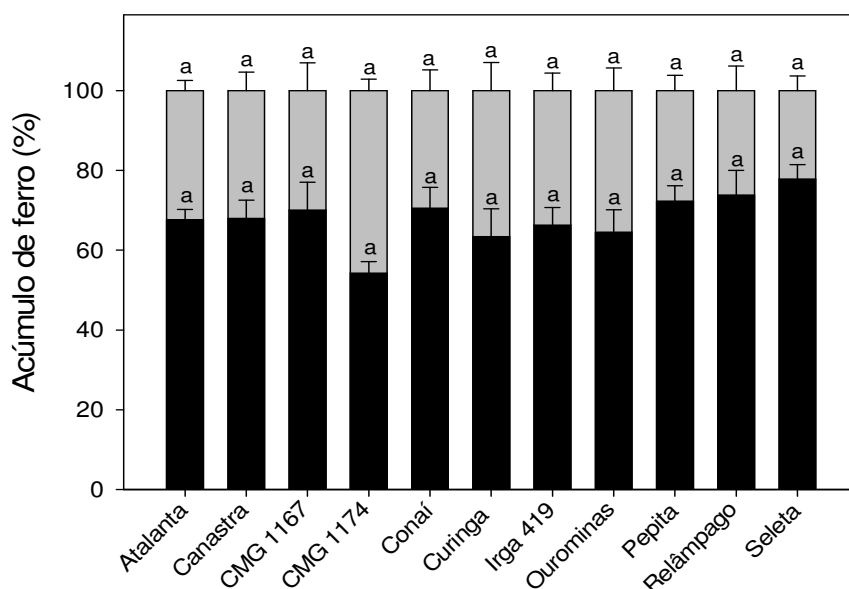


Figura 2. Acúmulo de ferro (%) nas raízes (■) e nas folhas (□) em cultivares de arroz cultivados sob $\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$ (7 mM), por sete dias, em solução. Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

O excesso de ferro na solução de cultivo afetou a absorção e translocação de outros elementos nas plantas de arroz. O ferro apresentou correlação positiva e significativa com B, Na, Ca, Zn, Sr e Mo nas raízes das plantas de arroz expostas ao $\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$ (7 mM) (Tab. 1). Os elementos Mg e K apresentaram correlação negativa com o Fe nas raízes das plantas de arroz. A translocação de Fe correlacionou-se positivamente com os elementos B, Na, S e Co. Os elementos Mg, P, K, Ca, Mn, Cu,

Rb, Sr e Mo apresentaram correlação negativa com o Fe nas folhas das plantas de arroz expostas ao excesso de Fe (Tab. 1).

Tabela 1. Correlação entre o teor de Fe e outros 17 elementos em raízes e folhas de onze cultivares de *Oryza sativa*, cultivados sob excesso de sulfato ferroso (FeSO₄-EDTA, 7 mM), por sete dias, em sistema hidropônico.

	B	Na	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Co
	0.353*	0.408*	-0.517*	0.132 ^{ns}	-0.002 ^{ns}	-0.410*	0.466*	-0.180 ^{ns}	-0.064 ^{ns}
Raízes	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd	
	-0.084 ^{ns}	-0.032 ^{ns}	0.327*	0.072 ^{ns}	0.006 ^{ns}	0.797*	0.300*	0.053 ^{ns}	
	B	Na	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Co
	0.552*	0.917*	-0.571*	-0.424*	0.380*	-0.649*	-0.405*	-0.503*	0.530*
Folhas	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd	
	0.150 ^{ns}	-0.343*	-0.059 ^{ns}	0.004 ^{ns}	-0.561*	-0.406*	-0.334*	0.039 ^{ns}	

* 1 %; ^{ns} não significativo

As respostas na taxa de assimilação líquida do CO₂ variaram entre os cultivares avaliados, com reduções expressivas nos cultivares BRS Atalanta (77 %), CMG 1174 (73 %), BRS Pepita (48 %), CMG 1167 (43 %) e IRGA 419 (42 %), em relação aos respectivos controles (Fig. 3A). A queda fotossintética foi acompanhada pela redução na condutância estomática (g_s), em até 89 % no cultivar BRS Atalanta, e na taxa transpiratórias (E) nas plantas de arroz (Figs. 3B e 3C). A relação C_i/C_a , no entanto, foi afetada em menor proporção nos cultivares de arroz cultivados sob excesso de ferro, com reduções significativas nos cultivar BRS Atalanta (22 %), CMG 1174 (15 %) e Conaí, BRSMG Seleta e BRSMG Relâmpago, com 13 % de redução em relação aos respectivos controles (Fig. 3D).

A fluorescência inicial da clorofila a (F_0) foi afetada de forma mais expressiva nos cultivares CMG 1174, com aumento de 21 %, seguido pelos cultivares BRS Atalanta, CMG 1167 e BRS Ourominas, com 13 %, em relação ao controle (Fig. 4A). O rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII; F_v/F_m), no entanto, apresentou redução significativa nos cultivar BRS Pepita (12 %), BRS Atalanta (10 %) e CMG 1174 (8%), em relação ao respectivo controle (Fig. 4B).

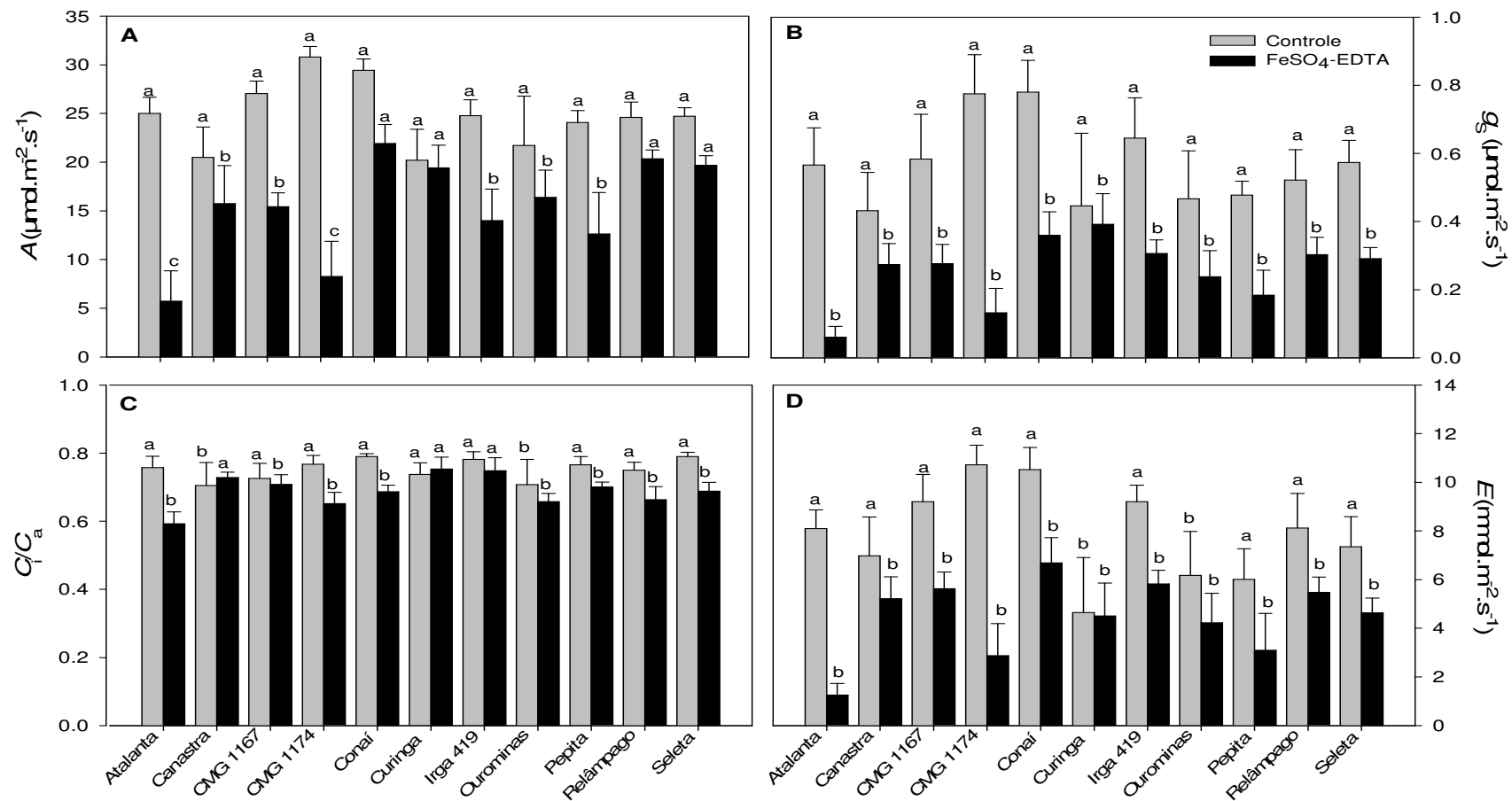


Figura 3. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A; A); condutância estomática (g_s; B); relação C_i/C_a (C) e taxa transpiratória (E) em cultivares de arroz cultivados sob FeSO₄-EDTA (7 mM), por sete dias, em solução. Barras representam médias ± EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott (p > 0,05).

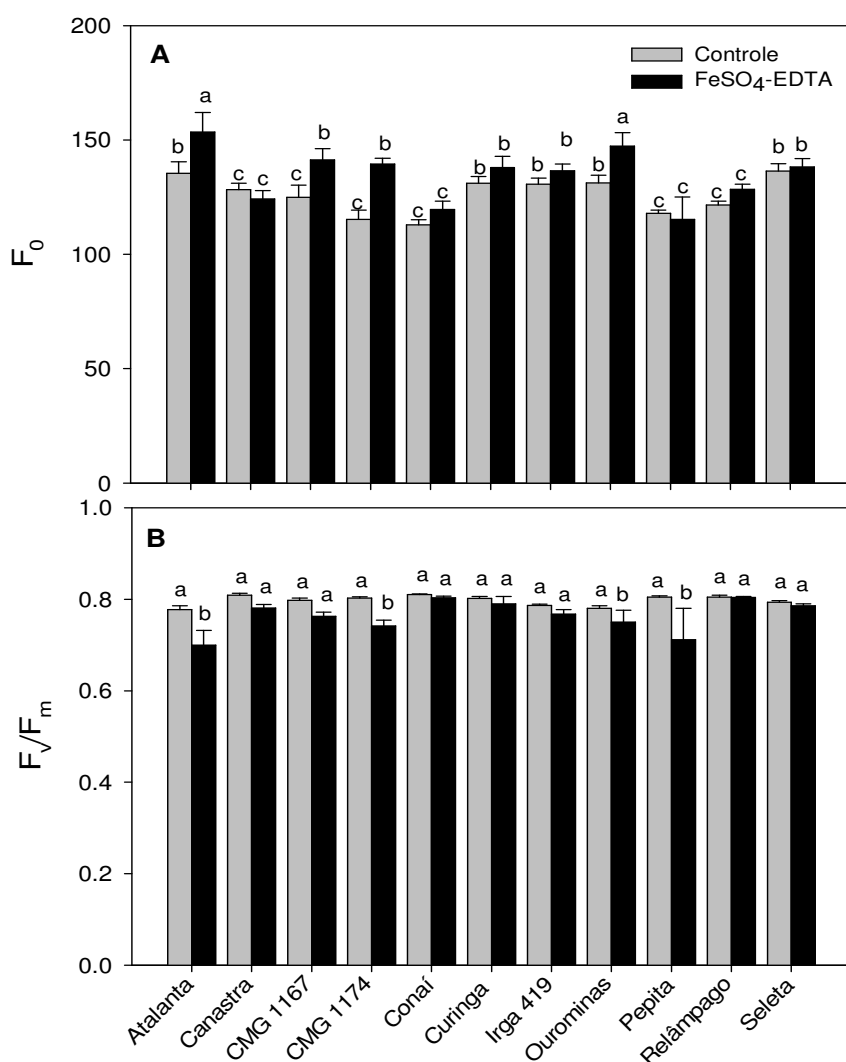


Figura 4. Fluorescência inicial da clorofila *a* (F_0 ; A) e rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII; F_v/F_m ; B) em cultivares de arroz cultivados sob FeSO₄-EDTA (7 mM), por sete dias, em solução. Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

A taxa de transporte de elétrons (*ETR*) foi afetada de forma mais expressiva nos cultivares CMG 1167, IRGA 419 e BRS Pepita, com redução de 29 %, 25 % e 15 %, respectivamente, em relação ao controle (Fig. 5A). A redução no *ETR* foi acompanhada por diminuição no quenching fotoquímico (q_p ; dados não mostrados) e rendimento quântico efetivo do fluxo linear de elétrons pelo FSII (Y_{II}) (Fig. 6A). A estimativa de centros de reações abertos no FSII (q_L) apresentou incremento significativo nas cultivares BRS Atalanta (188 %), BRS Pepita (129 %), BRS Ourominas (99 %) e CMG 1174 (73 %), em relação às plantas cultivadas em ambiente ideal de ferro (Fig. 5B).

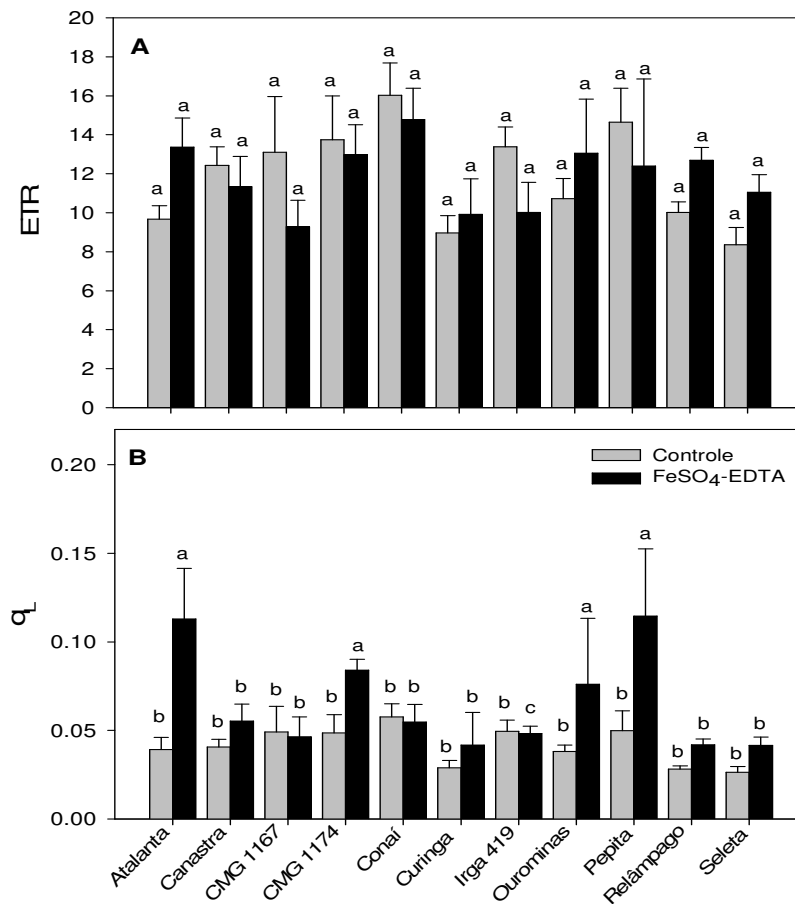


Figura 5. Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR ; A) e estimativa de centros de reações abertos no FSII (q_L ; B) em cultivares de arroz cultivados sob $FeSO_4$ -EDTA (7 mM), por sete dias, em solução. Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

O rendimento quântico da dissipação de energia regulada (Y_{NPQ}) aumentou em até 55 % no cultivar BRSMG Seleta, em relação ao controle, seguido pelos cultivares CMG 1174 (48 %), BRS Atalanta e BRSMG Relâmpago (34,5 %) e BRSMG Curinga, BRS Ourominas e BRS Pepita com 23 % (Fig. 6C). O aumento em Y_{NPQ} foi acompanhado pelo incremento mais expressivo no coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ, dados não mostrados). O rendimento quântico da dissipação de energia não regulada (Y_{NO}), de forma geral, não foi afetado significativamente e expressivamente nos cultivares avaliados, sob cultivo em excesso de ferro (Fig. 6B).

Os pigmentos fotossintéticos, clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides totais não foram afetados significativamente nos cultivares de arroz cultivados por sete dias sob exposição ao excesso de $FeSO_4$ -EDTA (Fig. 7A-C).

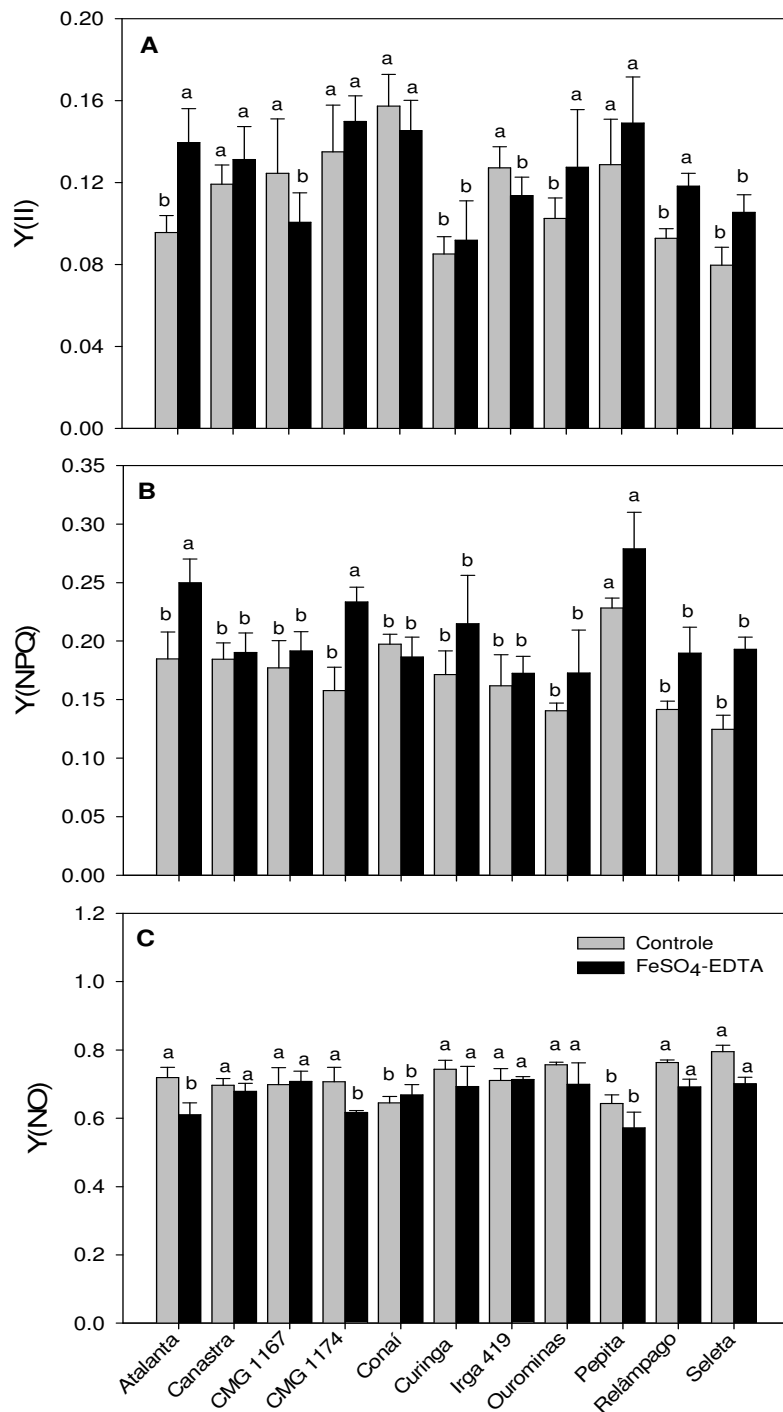


Figura 6. Rendimentos quânticos: efetivo do fluxo linear de elétrons pelo FSII (Y_{II} ; A), da dissipação de energia regulada (Y_{NPQ} ; B) e da dissipação de energia não regulada (Y_{NO} ; C) em cultivares de arroz cultivados sob $FeSO_4$ -EDTA (7 mM), por sete dias, em solução. Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

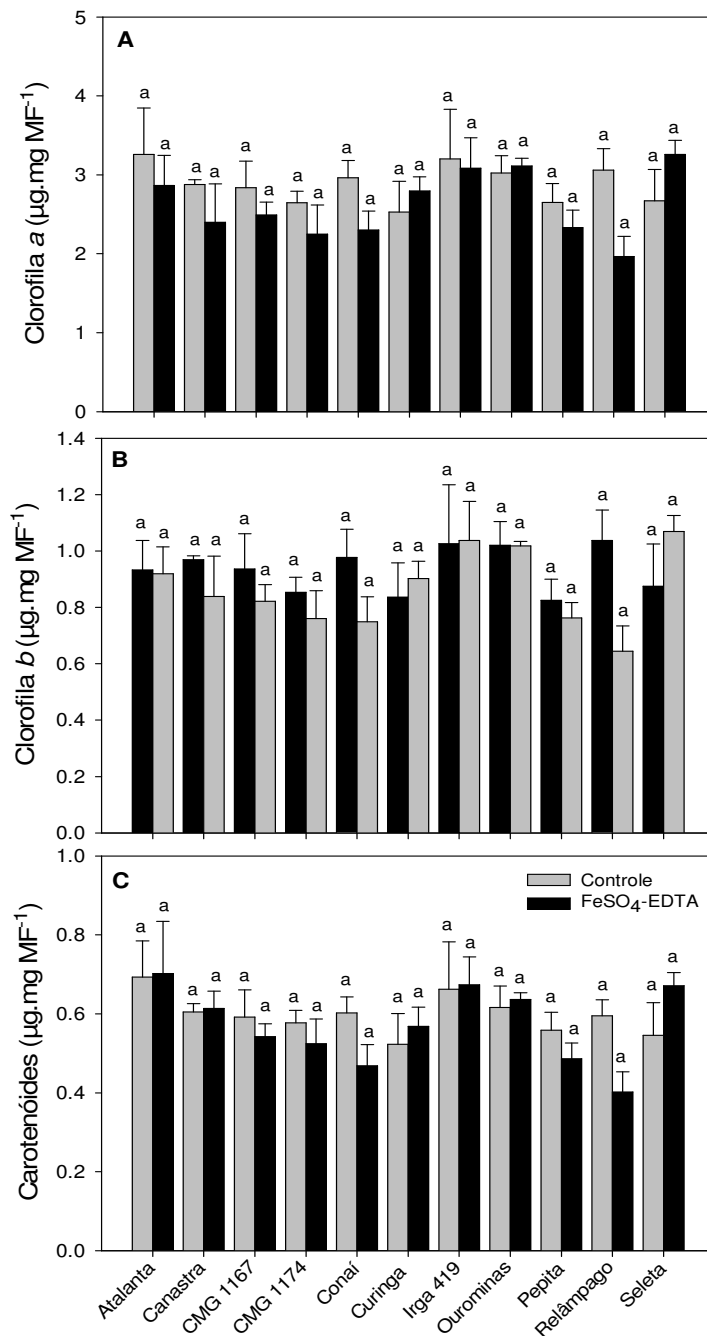


Figura 7. Teor de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e carotenóides totais (C) em cultivares de arroz cultivados sob FeSO₄-EDTA (7 mM), por sete dias, em solução. Barras representam médias \pm EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

O teor de malonaldeído (MDA) nas folhas apresentou de forma geral, incremento superior a 30 % nas plantas de arroz expostas ao excesso de ferro. Os aumentos mais expressivos de MDA foram observados nos cultivares BRS Atalanta (106 %), BRSMG Seleta e BRS Ourominas (86 %), CMG 1175 (59 %) e BRSMG Conaí (53 %) (Fig. 8).

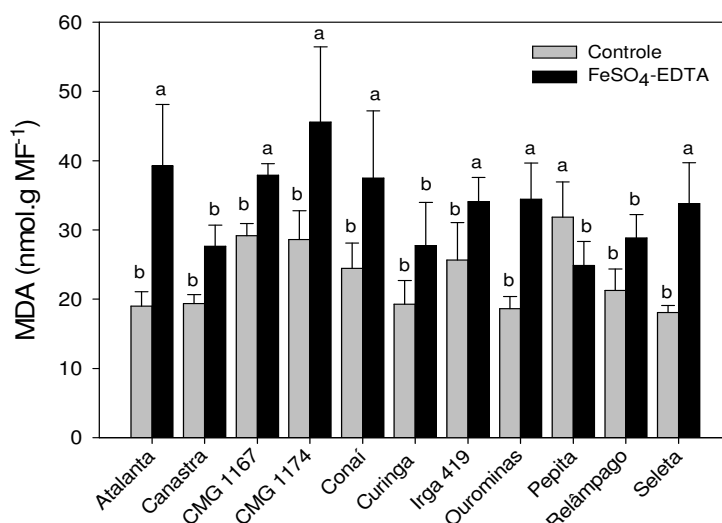


Figura 8. Teor de malonaldeído (MDA) em cultivares de arroz cultivados sob FeSO₄-EDTA (7 mM), por sete dias, em solução. Barras representam médias ± EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

A partir da análise multivariada das 19 variáveis fisiológicas obtidas, foi possível observar que as três primeiras variáveis canônicas respondem em 72,20 % (Tab. A1) da variância total de caracteres analisados, permitindo a representação da variabilidade manifestada entre os cultivares, em um gráfico tridimensional (Fig. A1).

As variáveis q_p , q_N , A e NPQ apresentaram maior contribuição relativa para a dissimilaridade, baseado pelo método de Singh (Tab. 2). O que demonstra que caracteres fotossintéticos e de dissipação de energia contribuem para a validação das inferências realizadas, permitindo a utilização dessas avaliações não invasivas na pré-seleção de cultivares tolerantes ao ferro.

O agrupamento pelo método UPGMA permitiu a obtenção de um dendrograma de dissimilaridade entre os cultivares (Fig. 9). O dendrograma permitiu verificar a formação de cinco grupos, dentre os quais, 3 cultivares, Atalanta, CMG 1167 e CMG

1174, pertencentes cada um a um grupo (III, IV e V), apresentaram alta sensibilidade ao Fe. Os cultivares Canastra e IRGA 419, dentre os cultivares avaliados, apresentaram maior tolerância fisiológica ao excesso de ferro em solução de cultivo.

Tabela 2. Contribuição relativa das variáveis avaliadas para a dissimilaridade pelo Método de Singh, a partir de médias não padronizadas.

Variável	S.j	%
q_P	867.62	25.906
q_N	374.52	11.183
A	286.87	8.566
NPQ	282.61	8.439
q_L	229.23	6.845
E	218.09	6.512
Y_{NO}	194.22	5.799
F_v/F_m	186.20	5.560
ETR	132.16	3.946
Carot	113.08	3.376
g_s	104.06	3.107
C_i/C_a	65.24	1.948
C_i	64.72	1.933
Chl_a	59.45	1.775
F_0	58.73	1.754
Y_{II}	52.58	1.570
Y_{NPQ}	40.47	1.208
MDA	12.08	0.361
Chl_b	7.13	0.213

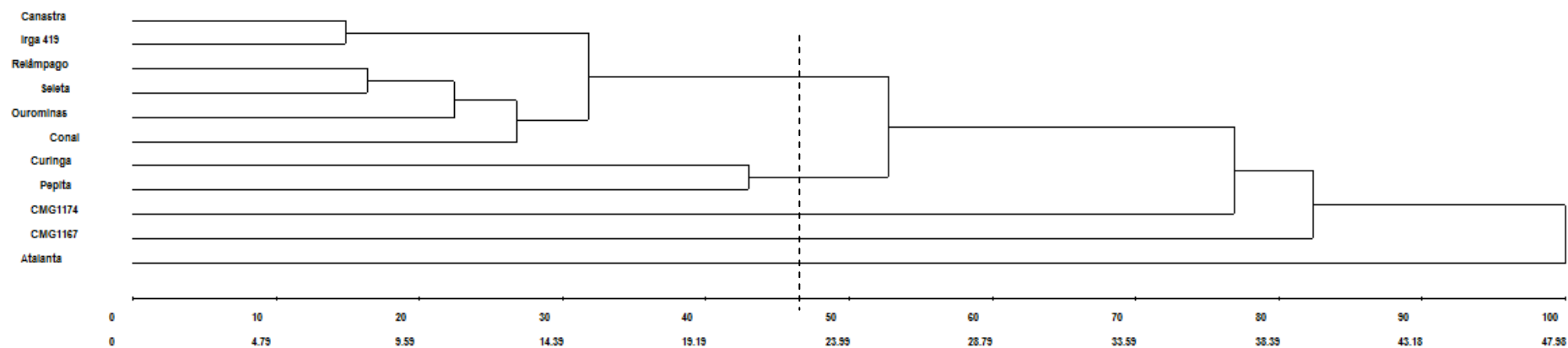


Figura 9. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre onze cultivares de arroz, pelo método de agrupamento através da ligação média entre grupos, UPGMA, baseado na distância de Mahalanobis (D^2), avaliado pelo índice relativo do efeito do excesso de ferro no cultivo das plantas de arroz.

4. DISCUSSÃO

A toxicidade por ferro é uma síndrome de desordem associada a altos teores de ferro reduzido (Fe^{+2}) na solução do solo (Becker e Asch, 2005). Os níveis tóxicos são descritos para o arroz em dosagens superiores a 300 mg kg^{-1} MS (Dobermann e Fairhurst, 2000), como observado nos cultivares em estudo (Fig. 1). O acúmulo de ferro nas raízes das plantas de arroz variou de acordo com o cultivar, independente do sistema de cultivo pré recomendado, sendo, em média, 15 vezes superior ao respectivo controle. O alto acúmulo de ferro pode ser devido a expressão de transportadores específicos de ferro. As plantas de arroz apresentam estratégias para aumentar a absorção deste metal, através da acidificação do meio e redução de Fe^{+3} a Fe^{+2} (Fox e Guerinot, 1998; Gross *et al.*, 2003), ou ainda quelação do metal com fitosideróforos (Schmidt *et al.*, 2003; Ishimaru *et al.*, 2006).

A toxidez por ferro, no entanto, requer além da absorção excessiva de Fe^{+2} pelas raízes, translocação, via fluxo transpiratório, para as folhas (Becker e Asch, 2005). A translocação de ferro, através do xilema, envolve transportadores de cátions (Curie *et al.*, 2000; Thomine *et al.*, 2003) ou associados com o transporte de metais quelados (Takahashi, 2003; Koike *et al.*, 2004; Guerinot, 2000). Dentre os cultivares avaliados, BRSMG Conaí e BRSMG Seleta proporcionaram uma menor translocação de ferro para a parte aérea das plantas de arroz cultivadas em excesso de ferro. Nesses cultivares, o ferro foi acumulado nas raízes em teores acima de 70 % do total. Linhagens tolerantes de arroz tem sido descritas pelo incremento mais lento de ferro nas raízes durante os estágios finais do desenvolvimento, sugerindo um mecanismo de exclusão de ferro pelas raízes dessas plantas (Nozoe *et al.*, 2004). Os cultivares Canastra, CMG 1174, IRGA 419 e BRS Pepita apresentaram um acúmulo de ferro nas folhas, em média, 5 vezes superior aos controles (Figs. 1-2).

O incremento nos teores de elementos como B, Na, Ca, Zn, Sr e Mo nas raízes das plantas de arroz expostas ao excesso de ferro (Tab. 1), sugerem que outros elementos podem ser transportados por carreadores utilizados para a absorção de Fe^{+2} (Curie e Briat, 2003). No entanto, alta concentração de ferro causou um desbalanço nutricional através de efeitos antagonísticos na absorção de outros nutrientes (Sahrawat, 2005; Silveira *et al.*, 2007), como Mg e K nas raízes e Mg, K, Ca, Mn, Cu, Rb, Sr e Mo nas folhas das plantas de arroz (Tab. 1). Elementos como o Mg e P são essenciais para a manutenção do metabolismo fotossintético das plantas que, sob deficiência podem

comprometer a ativação de enzimas essenciais para o metabolismo do carbono (Cakmak e Kirkby, 2008), teor de pigmentos fotossintéticos (Ding *et al.*, 2006; 2008; Esfandiari *et al.*, 2010), promovendo alterações na fotossíntese, pela redução no transporte de elétrons fotossintético (Wissuma *et al.*, 2005; Hermans e Verbruggen, 2005; Xu *et al.*, 2007).

A toxidez por ferro nas folhas, devido ineficiência na compartimentalização do excesso de ferro no apoplasto e vacúolos (Briat e Lobréaux, 1997) ou em moléculas de ferritina (Majerus *et al.*, 2009; Briat *et al.*, 2010) ocasionou redução na taxa fotossintéticas das plantas (Fig. 3A). A queda fotossintética foi mais expressiva nos cultivares BRS Atalanta, CMG 1174, BRS Pepita, CMG 1167 e IRGA 419, sendo acompanhada pela redução na condutância estomática. A concentração interna de CO₂, no entanto, não foi proporcionalmente diminuída em decorrência ao fechamento estomático (Fig. 3B-D). Este fato, associado à redução no teor de Mg e P nas folhas de plantas de arroz, sugerem que a diminuição na fotossíntese por ter ocorrido por alterações nas enzimas envolvidas no metabolismo do carbono, como a ribulose 1,5 – bifosfato (RuBP) carboxilase/oxigenase (Rubisco), e regeneração da RuBP (Taylor *et al.*, 1982; Desimone *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 2000; Heldt e Heldt, 2005; Farazdaghi, 2011).

A redução fotossintética foi acompanhada pela redução na taxa de transporte de elétrons (*ETR*), de forma mais expressiva nos cultivares CMG 1167, IRGA 419 e BRS Pepita (Fig. 5A). Danos na etapa fotoquímica da fotossíntese impedem a utilização da energia absorvida, gerando excesso de energia. A fluorescência inicial da clorofila *a* (F₀) representa a emissão de excitação pelo complexo antena (Krause e Weis, 1991). O aumento em F₀, induzido pelo excesso de ferro, como observado nos cultivares CMG 1174, BRS Atalanta, CMG 1167 e BRS Ourominas (Fig. 4A), indica disparidade na transferência de energia dos pigmentos do complexo coletor de luz para o centro de reação (Pereira, 2009). Uma vez transferida ao FSII, o excesso de energia pode ainda ser dissipado na forma de calor (Demmig-Adams e Adams, 1996; Baroli e Niyogi, 2000; Smirnoff, 2005), como observado pelo aumento do Y_{NPQ}. O aumento mais expressivo de Y_{NPQ} foi observado no cultivar BRSMG Seleta, seguido pelos cultivares CMG 1174, BRS Atalanta, BRSMG Relâmpago, BRSMG Curinga, BRS Ourominas e BRS Pepita (Fig. 6).

Danos nos complexos fotossintéticos têm sido descritos como decorrentes de estresse oxidativo gerado pelo excesso de ferro (Terry, 1980; Spiller e Terry, 1980;

Taylor *et al.*, 1982; Suh *et al.*, 2002; Mehraban *et al.*, 2008). O estresse oxidativo foi observado nos cultivares de arroz pelos altos teores de malonaldeído (MDA; Fig. 8), um composto indicativo de oxidação lipídica (Fang *et al.*, 2001). Os aumentos mais expressivos de MDA foram observados nos cultivares BRS Atalanta, BRSMG Seleta, BRS Ourominas, CMG 1175 e BRSMG Conaí.

5. CONCLUSÕES

Os cultivares de arroz BRS Atalanta, CMG 1167 e CMG 1174 apresentaram alta sensibilidade à toxidez por ferro, com reduções mais expressivas na taxa fotossintética e, com isso, alta dissimilaridade entre os tratamentos, para cada cultivar.

Os cultivares BRSMG Relâmpago e MRS Ourominas apresentaram moderada sensibilidade ao ferro, com mecanismos de dissipação do excesso de energia a fim de evitar o comprometimento e redução expressiva da fotossíntese.

Os cultivares Canastra, BRSMG Conaí e BRSMG Curinga, apesar da pré indicação para cultivo em sistema de sequeiro, demonstraram maior capacidade fisiológica de tolerar o excesso de ferro, entre os cultivares avaliados em condições de casa-de-vegetação.

O cultivar BRSMG Seleta apresentou possível mecanismo de exclusão de ferro, ao limitar a translocação de ferro absorvido para as folhas, além de dissipar excesso de energia na forma de calor, como mecanismo de proteção contra danos no FSII. Este cultivar, indicado para cultivo irrigado, apresenta, nas condições impostas, tolerância fisiológica ao excesso de ferro.

As análises uni e multivariadas mostraram-se apropriadas para a seleção de cultivares tolerantes ao ferro.

Os parâmetros fisiológicos são descritos pela alta sensibilidade em resposta aos níveis tóxicos de ferro. Trabalhos em casa-de-vegetação são importantes para uma pré-seleção de possíveis cultivares tolerantes, os quais precisam ser posteriormente confirmados em campo.

6. ANEXOS

Tabela A1. Variância (autovalores), variância percentuais e variâncias acumuladas das variáveis canônicas visando estimar a dissimilaridade entre os 11 cultivares de arroz.

Variáveis Canônicas	Variâncias (autovalores)	Variâncias percentuais	Variâncias Acumuladas
VC1	5.3307	35.4828	35.48
VC2	3.2238	21.4586	56.94
VC3	2.2924	15.2589	72.20
VC4	1.8140	12.0742	84.27
VC5	0.7999	5.3246	89.60
VC6	0.6977	4.6444	94.24
VC7	0.3670	2.4430	96.69
VC8	0.2569	1.7099	98.40
VC9	0.1688	1.1235	99.52
VC10	0.0721	0.4800	100.00
VC11	0.0000	0.0000	100.00
VC12	0.0000	0.0000	100.00
VC13	0.0000	0.0000	100.00
VC14	0.0000	0.0000	100.00
VC15	0.0000	0.0000	100.00
VC16	0.0000	0.0000	100.00
VC17	0.0000	0.0000	100.00
VC18	0.0000	0.0000	100.00
VC19	0.0000	0.0000	100.00

Tabela A2. Agrupamento de cultivares de *Oryza sativa*, pelo método de Tocher, com base no índice relativo 19 caracteres quantitativos.

Grupo	Cultivares/Trat
I	Canastra, IRGA 419, Relâmpago, Seleta, Conaí, Ourominas, Pepita, Curinga
II	CMG 1174
III	CMG 1167
IV	Atalanta

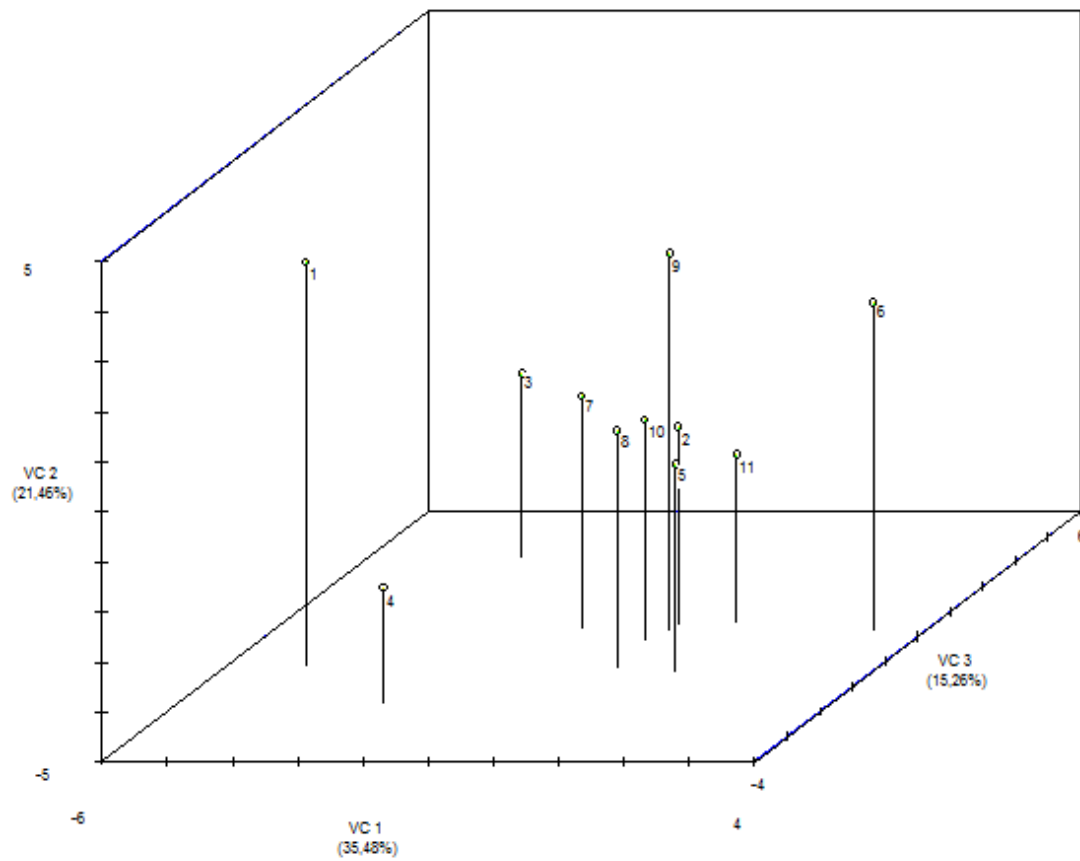


Figura A3. Dispersão gráfica dos escores da primeira (VC1, 35,48%) e da segunda (VC2, 21,46%) e da terceira (vc3, 15,26%) variável canônica as quais explicam o somatório de 71,20 % da dissimilaridade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abichequer, A.D.; Bohnen, H (1998) Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 22: 21-26
- Audebert, A.; Fofana, M. (2009) Rice Yield Gap due to Iron Toxicity in West Africa. **Journal of Agronomy & Crop Science** 195: 66-76
- Baker, N.R. (2008) Chlorophyll Fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology** 59: 89-113
- Baroli, I.; Niyogi, K.K. (2000) Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B** 355: 1385-1394
- Becana, M.; Moran, J.F.; Iturbe-Ormaetxe, I. (1998) Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil** 201: 137-147
- Becker, M.; Asch, F. (2005) Iron toxicity in rice - conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition Soil Science** 168: 558-573
- Bilger, W.; Björkman, O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis Research** 25: 173-185
- Bilger, W.; Schreiber, U.; Bock, M. (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia** 102: 425-432
- Bode, K.; Doring, O.; Luthje, S.; M, Bottger. (1995) Induction of iron toxicity symptoms in rice (*Oryza sativa* L.). **Mitteilungen aus dem Institut für allgemeine Botanik in Hamburg** 25: 35-43
- Briat, J.-F.; Curie, C.; Gaumard, F. (2007) Iron utilization and metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 10: 276-282
- Briat, J.-F.; Duc, C.; Ravet, K., Gaynard, F. (2010) Ferritins and iron storage in plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1800: 806-814
- Briat, J.-F.; Fobis-Loisy, I.; Grignon, N.; Lobreaux, S.; Pascall, N.; Savino, G.; Thoiron, S.; von Wiren, N.; Wuytswinkel, O. (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. **Biology of the Cell** 84:69-81
- Briat, J.-F.; Lobréaux, S. (1997) Iron Transport and storage in plants. **Trends in Plant** 2: 187-193
- Cakmak, I.; Kirkby, E. (2008). Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage. **Physiologia Plantarum** 133: 692-704
- Chen, R.F.; Shen, R.F.; Gu, Pei.; Dong, X.Y.; Du, C.W.; Ma, J.F. (2006) Response of rice (*Oryza sativa*) with root surface iron plaque under aluminium stress. **Annals of Botany** 98: 389-395
- Counce, P.; Keisling, T.C.; Mitchell, A.J. (2000) A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science** 40: 436-443

- Cruz, C.D.; Ferreira, F.M.; Pessoni, L.A. (2011) **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 620 p
- Cruz, J.A.; Avenson, T.J.; Kanazawa, A.; Takizawa, K.; Edwards, G.E.; Kramer, D.M. (2004) Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. **Journal of Experimental Botany** 56 (411): 395-406
- Curie, C.; Alonso, J.M.; Le Jean, M.; Ecker, J.R.; Briat, J.-F. (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. **Biochemical Journal** 347: 749-755
- Curie, C.; Briat, J.F. (2003) Iron transport and signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology** 54: 183-206
- Demmig-Adams, B.; Adams, W.W (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. **Trends in Plant Science** 1(1): 21-26
- Desimone, M.; Henke, A.; Wagner, E. (1996) Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. **Plant Physiology** 111: 789-796
- Ding, Y.; Luo, W.; Xu, G. (2006) Characterisation of magnesium nutrition and interaction of magnesium and potassium in rice. **Annals of Applied Biology** 149:111-123
- Ding, Y.-C.; Chang, C.-R.; Luo, W.; Wu, Y.-S.; Ren, X.-L.; Wang, P.; Xu, G.-H. (2008) High Potassium Aggravates the Oxidative Stress Induced by Magnesium Deficiency in Rice Leaves. **Pedosphere** 18(3): 316–327
- Dobermann, A.; Fairhurst, T. (2000) Toxicidad de hierro en arroz. *In*: Dobermann, A.; Fairhurst, T. (Eds.). **Rice: nutrient disorders & nutrient management**. Potash and Phosphate Institute and International Rice Research Institute. p. 1-4
- Eaton, J.W.; Qian, M. (2002) Molecular bases of cellular iron toxicity. **Free Radical Biology and Medicine** 32: 833-840
- Ehleringer, J. (1981) Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. **Oecologia** 102: 366-370
- Esfandiari, E.; Shokrpour, M.; Alavi-Kia, S. (2010) Effect of Mg deficiency on antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation. **Journal of Agricultural Science** 2(3): 131-136
- Fang, W.; Wang, J.; Lin, C.; Kao, C. (2001) Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation** 35: 75-80
- Farazdaghi, H. (2011) The single-process biochemical reaction of Rubisco: A unified theory and model with the effects of irradiance, CO₂ and rate-limiting step on the kinetics of C₃ and C₄ photosynthesis from gas exchange. **Biosystems** 103(2): 265-284
- Fox, T.C.; Guerinot, M.L (1998) Molecular biology of cation transport in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 49: 669-696
- Genon, J.; Hepcée, N.; Duffey, J.; Delvaux, B.; Hennebert, P. (1994) Iron toxicity and other chemical soil constraints to rice in highland swamps of Burundi. **Plant and Soil** 166: 109-115

- Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta** 990: 87-92
- Golding, A.J.; Johnson, G.N. (2003) Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. **Planta** 218: 107-114
- Gross, J.; Stein, R.J.; Fett-Neto, A.G.; Fett, J.P. (2003) Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology** 26: 477-497
- Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta** 1465: 190-198
- Guo, W.; Zhu, Y.-G.; Liu, W.-J.; Liang, Y.-C.; Geng, C.-N.; Wang, S.-G. (2007) Is the effect of silicon on rice uptake of arsenate (As^V) related to internal silicon concentrations, iron plaque and phosphate nutrition? **Environmental Pollution** 148: 251-257
- Heldt, H.-W.; Heldt, F. (2005) **The Calvin cycle catalyzes photosynthetic CO₂ assimilation**. In: Heldt, H.-W. (ed.) *Plant Biochemistry* (3 Ed) p. 165-193
- Hendrickson, L.; Furbank, R.T.; Chow, W.S. (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. **Photosynthesis Research** 82: 73-81
- Hermans, C.; Verbruggen, N. (2005). Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of experimental botany** 56: 2153-2161
- Hodges, D.M.; DeLong, J.M.; Forney, C.F.; Prange, R.K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta** 207: 604-611
- Ishimaru, Y.; Suzuki, M.; Tsukamoto, T.; Suzuki, K.; Nakazono, M.; Kobayashi, T.; Wada, Y.; Watanabe, S.; Matsuhashi, S.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishisawa, N.K. (2006) Rice plants take up iron as an Fe^{3+} -phytosiderophore and as Fe^{2+} . **Plant Journal** 45: 335-346
- Joliot, P.; Joliot, A. (2006) Cyclic electron flow in C3 plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1757: 362-368
- Koike, S.; Inoue, H.; Mizuno, D.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. **The Plant Journal** 39: 415-424
- Kramer, D.M.; Johnson, G.; Kiirats, O.; Edwards, G.E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. **Photosynthesis Research** 79: 209-218
- Krause, G.H.; Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 42:313-349
- Lahner, B.; Gong, T.; Mahmoudian, M.; Smith, E.L.; Abid, K.B.; Rogers, E.E.; Guerinot, M.L.; Harper, I.F.; Ward, J.M.; Meintyre, L.; Schroeder, J.I.; Salt, D.E. (2003) Genomic scale profiling of nutrients and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology** 21:1215-1225

- Laisk, A.; Loreto, F. (1996) Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. **Plant Physiology** 110: 903-912
- Lichtenthaler, H.K.; Buschmann, C.; Knapp, M. (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio Rfd of leaves with the PAM fluorometer. **Photosynthetica** 43 (3): 379-393
- Liu, H.; Zhang, J.; Christie, P.; Zhang, F. (2008) Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. **Science of the Total Environment** 394: 361-368
- Liu, H.-J.; Zhang, J.-L.; Zhang, F.-S. (2007) Role of iron plaque in Cd uptake by and translocation within rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in solution culture. **Environmental and Experimental Botany** 59: 314-320
- Lupínková, L.; Komenda, J. (2004) Oxidative modifications of the photosystem II D1 protein by reactive oxygen species: from isolated protein to cyanobacterial cells. **Photochemistry and Photobiology** 79(2): 152-162
- Majerus, V.; Bertin, P.; Lutts, S. (2009) Abscisic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. **Plant Soil** 324: 253-265
- Majerus, V.; Bertin, P.; Swenden, V.; Fortemps, A.; Lobréaux, S.; Lutts, S. (2007) Organ-dependent responses of the African rice to short-term iron toxicity: ferritin regulation and antioxidative responses. **Biologia Plantarum** 51: 303-312
- Mehraban, P.; Zadeh, A.A.; Sadeghipour, H.R. (2008) Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition. **Asian Journal of Plant Sciences** 1-9
- Mishra, S.; Dubey, R.S. (2005) **Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants**. Cap 45. In: Pessaraki, M. (ed.) Handbook of Photosynthesis. 2 ed. 862 p
- Mitchell, R.A.C.; Theobald, J.C.; Parry, M.A.J.; Lawlor, D.W. (2000) Is there scope for improving balance between rubp-regeneration and carboxylation capacities in wheat at elevated CO₂? **Journal of Experimental Botany** 51: 391-398
- Murgia, I.; Delledonne, M.; Soave, C. (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in Arabidopsis. **The Plant Journal** 30: 521-528
- Nozoe, T.; Agbisit, R.; Fukuta, Y.; Rodriguez, R.; Yanagihara, S. (2004) The Iron (Fe)-excluding power of rice roots as a mechanism of tolerance of elite breeding lines to iron toxicity. **Proceedings of the 40. International Crop Science Congress**: Brisbane, Austrália p. 1-6
- Oxborough, K. (2004) Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. **Journal of Experimental Botany** 55(400): 1195-1205
- Oxborough, K.; Baker, N.R. (1997) An instrument capable of imaging chlorophyll *a* fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at the cellular and sub-cellular levels of organization. **Plant, Cell and Environment** 20: 1473-1483
- Pereira, E.G. (2009) **Efeitos tóxicos do ferro: alterações fisiológicas e morfológicas em plantas cultivadas e de restinga**. Tese de Doutorado: Universidade Federal de Viçosa. 117 p

- Sahrawat, K.L. (2005) Managing iron toxicity in lowland rice: the role of tolerant genotypes and plant nutrients. Session 15: Challenges to expanding rice production in unfavorable environments, p 452-254. In: Toriyama K, Heong KL, Hardy B (eds.) **Rice is life: scientific perspectives for the 21st century**. Proceedings of the World Rice Research Conference held in Tokyo and Tsukuba, Japan 590 p
- Scandalios, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology** 101: 7-12
- Schmidt, W.; Michalke, W.; Schikora, A. (2003) Proton pumping by tomato roots. Effect of Fe deficiency and hormones on the activity and distribution of plasma membrane H⁺-ATPase in rhizodermal cells. **Plant, Cell and Environment** 26: 361-370
- Silveira, V.C.; Oliveira, A.P.; Sperotto, R.A.; Amaral, L.; Dias, J.F.; Cunha, J.B.; Fett, J.P. (2007) Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 19: 127-139
- Sinha, S.; Gupta, M.; Chandra, P. (1997) Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: responde of antioxidants. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 38: 286-291
- Smirnoff, N. (2005) **Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions**. In: Smirnoff, N. (Ed.) Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd. p. 53-86
- Snowden, R.; Wheeler, B.D. (1995) Chemical changes in selected wetland plant species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. **New Phytologist** 131: 503-520
- Sousa, R.O.; Gomes, A.S.; Vahl, L.C. (2004) **Toxidez por ferro em arroz irrigado**. In: Gomes, A.S.; Magalhães Jr. (eds.) Arroz Irrigado no Sul do Brasil: Empraba Informação Tecnológica. p. 305-337
- Spiller, S.; Terry, N. (1980) Limiting Factors in Photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. **Plant Physiology** 65: 121-125
- Suh, H.-J.; Kim, C.S.; Lee, J.-Y.; Jung, J. (2002) Photodynamic Effect of Iron Excess on Photosystem II Function in Pea Plants. **Photochemistry and Photobiology** 75(5): 513-518
- Takahashi, M. (2003) Overcoming Fe deficiency by a transgenic approach in rice. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 72: 211-220
- Taylor, G. J.; Crowder, A. A.; Rodden, R. (1984) Formation and morphology of an iron plaque on the roots of *Typha latifolia* L. grown in solution culture. **American Journal of Botany** 71(5): 666-675
- Taylor, G.J.; Crowder, A.A. (1983) Use of the DCB technique for extraction of hydrous iron oxides from roots of wetland plants. **American Journal of Botany** 70: 1254-1257
- Taylor, S.E.; Terry, N.; Huston, R.P. (1982) Limiting Factors in Photosynthesis. III. Effects of iron nutrition on the activities of three regulatory enzymes of photosynthetic carbon metabolism. **Plant Physiology** 70: 1541-1543
- Terry, N. (1980) Limiting Factors in Photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. **Plant Physiology** 65: 114-120

- Thipyapong, P.; Melkonian, J.; Wolfe, D.W.; Steffens, J.C. (2004): Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. **Plant Science** 167: 693-704
- Thomine, S.; Lelièvre, F.; Debarbieux, E.; Schroeder, J.I.; Barbier-Brygoo, H. (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. **The Plant Journal** 34: 685-695
- Vansuyt, G.; Lopez, F.; Inzé, D.; Briat, J.F.; Fourcroy, P. (1997). Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. **FEBS Letter** 410: 1195-1200
- Wellburn, A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology** 144: 307-313
- Wissuwa, M.; Garnat, G.; Ismail, A.M. (2005) Is root growth under phosphorus deficiency affected by source or sink limitations? **Journal of Experimental Botany** 56 (417): 1943-1950
- Xu, H.X.; Weng, X.Y.; Yang, Y. (2007) Effect of Phosphorus Deficiency on the Photosynthetic Characteristics of Rice Plants. **Russian Journal of Plant Physiology** 54(6): 741-748
- Yamauchi, M.; Peng, X.X. (1995) Iron toxicity and stress induced ethylene production in rice leaves. **Plant and Soil** 173: 21-28
- Zancani, M.; Peresson, C.; Biroccio, A.; Federici, G.; Urbani, A.; Murgia, I.; Soave, C.; Micali, F.; Vianello, A.; Macri, F. (2004) Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. **European Journal of Biochemistry** 271: 3657-3664
- Zhou, X.-B.; Shi, W.-M. (2007) Effect of root surface iron plaque on se translocation and uptake by fe-deficient rice. **Pedosphere** 17(5): 580-587

CONCLUSÕES GERAIS

O sulfato ferroso apresentou alta toxidez às plantas de arroz. Esta forma de ferro é prontamente disponível às plantas, em solos irrigados, como na situação imposta no presente trabalho. O excesso de ferro nos tecidos promoveu alterações fisiológicas, anatomorfológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas de arroz.

Os cultivares de arroz apresentaram, de forma diferencial, como mecanismo de defesa, o aumento da dissipação regulada de energia e da expressão do gene da ferritina, relacionado à homeostase do ferro.

Dentre os parâmetros avaliados, a taxa fotossintética e a taxa de transporte de elétrons mostraram-se altamente sensíveis ao excesso por ferro. Estes parâmetros, por serem não invasivos, se tornam ferramentas importantes, de campo, na seleção de cultivares tolerantes ao metal.